

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Inmunología



TESIS DOCTORAL

**Dirección de antígenos a receptores de células
presentadoras de antígeno como estrategia para
aumentar la inmunogenicidad de vacunas en la
especie porcina**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Teresa Poderoso García

Directores:

**Javier Domínguez Juncal
Concepción Revilla Calvo**

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-695-0330-0

© Teresa Poderoso García, 2011

Facultad de Medicina

Universidad Complutense
de Madrid

Dirección **d**e **A**ntígenos a **r**eceptores
de **C**élulas **p**resentadoras **d**e **a**ntígeno
Como **e**strategia **p**ara **a**umentar **l**a
immunogenicidad **d**e **v**acunas **e**n **l**a
especie **p**orcina.

Teresa Poderoso García
2011

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA

DIRECCIÓN DE ANTÍGENOS A RECEPTORES
DE CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO
COMO ESTRATEGIA PARA AUMENTAR LA
INMUNOGENICIDAD DE VACUNAS EN LA
ESPECIE PORCINA

TESIS DOCTORAL

TERESA PODEROSO GARCÍA

DIRIGIDA POR
JAVIER DOMÍNGUEZ JUNCAL Y CONCEPCIÓN REVILLA
CALVO

MADRID, 2011



Los doctores Javier Domínguez Juncal y Concepción Revilla Calvo, investigadores del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA),

CERTIFICAN:

Que la tesis titulada “Dirección de antígenos a receptores de células presentadoras de antígeno como estrategia para aumentar la inmunogenicidad de vacunas en la especie porcina” y presentada por Teresa Poderoso García, ha sido realizada bajo su dirección, en el departamento de Biotecnología del INIA, considerando que reúne los requisitos para optar al grado de doctor en Biología.

VºBº de los DIRECTORES

Fdo.: Javier Domínguez Juncal

Fdo.: Concepción Revilla Calvo

El interesado

Fdo.: Teresa Poderoso García

A mi familia.
A Álvaro.

Bueno, pensé que nunca llegaría pero sí, al final la tesis ya está escrita y sólo quedan los agradecimientos...¡qué momento! Escribir esto en pocas palabras va a ser complicado, podría escribir muchísimas anécdotas y buenos ratos, pero lo intentaré que luego me dicen que soy una rollera...

En primer lugar me gustaría agradecer a Javier y a Conchi la oportunidad que me dieron de realizar mi tesis doctoral bajo su dirección. Durante estos años he aprendido muchísimo y me considero afortunada de que hayáis sido vosotros los que me han formado en el mundo de la investigación. Gracias a los dos por todas esas reuniones que duraban horas, por dejar todo lo que estuviésemos haciendo para echarme una mano, por tener siempre un plan B cuando las cosas se ponían difíciles, por vuestra paciencia...

Javier, tienes la capacidad de hacer que la gente que tienes al lado se empape de conocimiento "por difusión" y contagias tus ganas de conocer siempre algo más. Siempre has sabido darme ánimos cuando lo he necesitado y celebrar cuando había que celebrar... ¡menuda comilona nos dimos el día que confirmamos que nuestro primer scFv funcionaba!

Conchi... ¡qué decirte! En todo este tiempo has estado conmigo codo con codo en la poyata, en la cabina, corriendo delante del cerdo, explicándome cada experimento, comentándome cada publicación interesante...pero además de considerarte una gran jefa también te considero mi amiga, de esas con las que te vas de cañas, a la pelu, le cuentas tus cosas y a que le dices que te acompañe a imprimir la tesis para tener apoyo moral...muchas gracias!

También quiero tener unas palabras de agradecimiento a "mis otros jefes". Ángel, muchas gracias por haberme ayudado tantísimo con la Genética Molecular, por todas las horas que les has echado explicándome PCRs, diseños de primers, clonajes... y por esos esquemas que hacían que todo tuviera mucho más sentido. Y a Fernando, por hacernos volver tantas veces de nuestras divagaciones y ser tan exquisito con el lenguaje... ¡escribir un e-mail a la RALE para saber si existía la palabra direccionamiento me pareció muy grande! Además, gracias a ti, nunca se me olvidará qué es una avutarda, jeje...

Y bueno, ¡¡¡ahora vienen todas las chicas!!! Lo primero, que ha sido un verdadero lujo teneros a todas de compañeras de laboratorio, muchas gracias por todo lo que me habéis ayudado, sobre todos estos meses, y por el ambiente tan genial que se respira con vosotras...

Belén...¡gracias por todo! Por enseñarme tantísimas cosas, sobre todo de Genética Molecular, por ofrecerme siempre tu ayuda, por estar siempre tan pendiente de mí y darme ánimos, por esas conversaciones en el coche, por esos bombones, semillas, zapatos...¡es que no se te escapa una! Y por supuesto, por ser un ejemplo de fortaleza...

Paloma, ¡ay Paloma! Mira que es divertido estar contigo todo el día a la gresca, lo voy a echar de menos, eso y cómo nos pones a todas como una vela en el labo, los marujeos que nos hemos echado en copito, lo optimista y alegre que eres siempre... y que experimento que haces, experimento que sale...¡si va a ser verdad de que eso de ser tan cuadrículada funciona, jeje...¡mil gracias por todo!

Sara, qué puedo decirte que tú ya no sepas...¡qué son muchos años! Me siento muy afortunada de haber podido trabajar día a día con una de mis mejores amigas...porque si hemos logrado superar un experimento con 25 cerdos, pestilentes aromas, proliferaciones poco agradecidas y elisas-tetris...esta amistad tiene que durar para siempre sí o sí! Muchas gracias por todo lo que me has ayudado en el labo y fuera de él.

Helen! Gracias por todas esas pequeñas cosas que me han ido haciendo la vida más fácil, por ayudarme con los millones de sueros de los cerdos, por tu ayuda con las gigapreps y las inmunos, por todo el tiempo y el esfuerzo que pusiste en el clonaje del scFv 1D9 GFP y, sobre todo por aguantar todas mis explicaciones rolleras! (pobrecilla, y encima con una sonrisa en la cara...). ¡Sigue siendo tan creativa!

Maite, ¡gracias por ser tú! Hago mía una frase que dijo Conchi una vez sobre ti... "*Maite hace que te sientas mejor persona simplemente estando a su lado*". Gracias por hacernos todo un poco más fácil, por tu alegría y tu humildad.

María, qué gran fichaje! En todos los sentidos porque como ex flu y veterinaria nos estás ayudando mucho con todas las cosas de los cerditos y el virus pero además, tu simpatía, vitalidad y tu alegría nos anima cada día en el labo, sobre todo las comidas...gracias por todos los ánimos que me has dado estos meses y por conseguir que se me olvidara por momentos todo el lío de la tesis.

Sylvina, gracias por enseñarme que en esta vida siempre hay que sonreír, aunque a veces no te dejen...

Y a todas las demás chicas, Elena P, Zo, Vero, Ana...que aunque con vosotras entre unas cosas y otras he tenido menos contacto (estos meses de enclaustramiento han influido) también habéis estado ahí peleando con los sobrenadantes de los scFv, su purificación, las inmunos...o simplemente con unas palabras de ánimo...muchas gracias a vosotras también.

¡Y las flus! Menuda revolución cuando llegasteis. Gustavo, M^a Ángeles, Chari, Carmen, Blanca, le habéis muchísima vidilla al labo y con vosotros hemos aprendido mucho de gripe...¡valió la pena apretarse un poquito!

Y gracias a toda la gente del departamento, Nere, Julio, Laura, Silvia, Carmen, María y a todos los demás, por las excursiones, las comidas en el bosquecillo, las cenas de navidad, el country y por lo pendiente que habéis estado de mí sobre todo estos últimos meses.

También dale las gracias a la gente del laboratorio del Dr. Jose M^a Castro, a Cinta, a Fran y a Javi, por proporcionarme siempre las muestras que he necesitado y por todos los consejos que me han dado.

Y al Cresa, porque durante gran parte de esta tesis me han financiado, gracias!

Ya en el ámbito más personal, sobre todo quería aprovechar este momento para agradecer a mis padres todo lo que han hecho por mí a lo largo de mi vida...por luchar contra viento y marea dándome más de lo que tenían para ofrecerme, la oportunidad que ellos no tuvieron de estudiar y trabajar en algo que me apasiona...sin vosotros no sería lo que soy y no hay palabras en el mundo para agradecerlos. Y a mis hermanas, claro, por supuesto ellas también me han definido como persona, me han apoyado y escuchado siempre, han estado ahí cuando lo he necesitado y las pobres han tenido que oír hablar de mis cerditos incluso a la hora de la comida...la confianza da asco, jeje! Y al resto de mi familia, en especial a mi tía Tere, que siempre me ha preguntado con esos ojos de curiosidad y ese ansia de saber y desde muy pequeña ha intentado transmitirme la importancia de la cultura, el conocimiento y la ciencia.

Por supuesto no pueden faltar todos mis amig@s! Elvira, Noe, Luci, María, Laura, juntas hemos vivido esos días de facultad, de interminables horas de prácticas, épocas de exámenes eternos, excursiones por el campo... y estar con vosotras los han convertido en días inolvidables...gracias por estar en mi vida, por esas

vacaciones en la playa, por esas tardes y noches de cháchara, por cada momento que me habéis dado y por los que nos quedan...

Raul, Patty, Noe, Álvaro, Sara (otra vez aquí), porque os habéis convertido en parte fundamental de mi vida (aunque al principio me miraseis mal en prácticas de Genética Molecular, jeje), porque con vosotros los últimos años de carrera fueron increíbles y porque todo lo que hemos vivido después impresionante...gracias por esos días en el labo de Manso, por esos jueves en el Camuñas, por los fines de semana en la Marina, por los sanedrines y seminarios on line y, sobre todo, por ser como sois...geniales!

Y a todos los no-biólogos (también os queremos, hombre), Fermín, Willy, Luis, Álvaro, Carlos, Miguel, Juanjo...por todos los grandes momentos que hemos vivido juntos, los ánimos que me habéis dado estos meses y todo vuestro apoyo...se os quiere, chicos!

Y llegó el momento de darte las gracias a ti, Álvaro...gracias porque a tu lado todo es más fácil, mejor...no sé cómo lo haces pero siempre consigues que desaparezcan todas las preocupaciones, que cada día sea especial, que me sienta especial, que siempre sonría...tengo la gran suerte de compartir mi vida con mi mejor amigo, gracias!

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AcMo	Anticuerpo monoclonal
Ag	Antígeno
APC	Célula presentadora de antígeno (<i>Antigen-presenting cell</i>).
BSA	Albúmina de Suero Bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
bp	Pares de bases
CHO	Células de ovario de hamster chino (<i>Chinese Hamster Ovary</i>)
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
DC	Célula dendrítica (<i>Dendritic Cell</i>)
DEPC	Dietilpirocarbonato
DI₅₀CT	Dosis infectiva al 50%
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato (<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilen-diamino tetraacético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (<i>Fluorescein isothiocyanate</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
HRP	Peroxidasa de rábano picante (<i>Horseradish Peroxidase</i>)
Ig	Inmunoglobulina
i.d.	Intradérmica
i.m.	Intramuscular
Kb	Kilobase de DNA
LAL	Lisado de amebocitos de <i>Limulus</i> (<i>Limulus Amebocyte Lysate</i>)
LPS	Lipopolisacárido
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad (<i>Mayor Histocompatibility Complex</i>)
MoDC	Célula dendrítica derivada de monocito (<i>Monocyte-derived DC</i>)
MOI	Multiplicidad de infección (<i>Multiplicity Of Infection</i>)
PBS	Tampón fosfato salino
PE	Ficoeritrina (<i>Phycoerythrin</i>)
s.c.	Subcutáneo
scFv	<i>Single chain Fv</i>
SCS	Seno subcapsular (<i>Subcapsular sinus</i>)
SFB	Suero fetal bovino
SLA	Complejo de antígenos leucocitarios del cerdo (<i>Swine Leucocyte Antigens</i>)
Sn	Sialoadhesina
SRRP	Síndrome respiratorio y reproductivo porcino
TA	Temperatura ambiente
T_{AN}	Temperatura de anillamiento
T_F	Temperatura de fusión
TF	Tampón de fluorescencia
V_H	Dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo
V_L	Dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo

INTRODUCCIÓN

1.	GÉNESIS DE LA RESPUESTA INMUNE.....	1
1.1.	Células presentadoras de Ag.....	1
1.1.1.	Células dendríticas (DCs).....	1
1.1.2.	Macrófagos.....	5
1.1.3.	Monocitos.....	8
1.2.	Activación de los linfocitos T y B.....	10
2.	ESTRATEGIAS PARA GENERAR VACUNAS MÁS EFECTIVAS QUE TIENEN COMO DIANA LAS APCs.....	14
2.1.	Reclutamiento de las APCs.....	15
2.2.	Estimulación de las APCs.....	16
2.3.	Dirigir Ag a la superficie de las APCs	17
2.3.1	Criterios a considerar en la selección de un receptor al que dirigir el Ag.....	19
2.3.1.1	Expresión restringida a las APCs.....	19
2.3.1.2	Endocitosis del Ag y presentación antigénica a los linfocitos.....	21
2.3.2	Vectores para dirigir el Ag.....	22
2.3.3	Receptores seleccionados.....	25
2.3.3.1	Sialoadhesina.....	25
2.3.3.2	CD163.....	27
2.3.3.3	TLR2.....	28
3.	VACUNAS DE DNA.....	30
4.	VIRUS DEL SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO (SRRP).....	35

OBJETIVOS.....	39
-----------------------	-----------

MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
--------------------------------	-----------

1.	ANIMALES.....	41
2.	CÉLULAS Y LÍNEAS CELULARES.....	41
2.1.	Células mononucleares de sangre periférica.....	41
2.2.	Monocitos.....	41
2.3.	Células dendríticas derivadas de monocitos (MoDC).....	42
2.4.	Células T.....	42
2.5.	Macrófagos alveolares.....	42
2.6.	Células de bazo y ganglios linfáticos.....	42
2.7.	Líneas celulares empleadas en los ensayos de transfección	43
3.	ANTICUERPOS.....	44
3.1.	Producción de AcMo en sobrenadantes de cultivo.....	45
3.2.	Cuantificación de anticuerpos presentes en sobrenadantes de cultivo.....	45
3.3.	Purificación de AcMo.....	46
3.4.	Marcaje de los AcMo.....	46
3.4.1.	Marcaje con Biotina.....	46

3.4.2. Marcaje con Alexa.....	46
4. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE ENDOTOXINA BACTERIANA.....	47
5. CITOMETRÍA DE FLUJO.....	47
6. INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFUORESCENCIA.....	48
7. OBTENCIÓN Y MARCAJE PARA SU ANÁLISIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO DE SUSPENSIONES CELULARES DE BAZO Y GÁNGLIOS LINFÁTICOS.....	49
7.1. Disgregación de los órganos.....	49
7.2. Citometría.....	49
8. VIRUS DEL SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO (SRRP).....	50
8.1. Producción del virus del SRRP.....	50
8.2. Titulación del virus SRRP.....	51
9. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOS AcMo ANTI-Sn, ANTI-CD163 y ANTI-TLR2 DE DIRIGIR Ag A APCs.....	51
9.1. Estudio de la capacidad de endocitosis de los receptores Sn, CD163 y TLR2 al unirse a ellos los AcMo 1F1, 2A10 y 1H11.....	51
9.2. Modulación de la expresión de la molécula de Sn en monocitos mediante citoquinas.....	52
9.3. Evaluación in vitro del efecto de dirigir Ag a los receptores Sn, CD163 y TLR2.....	52
9.3.1. Modelo experimental.....	52
9.3.2. Inmunizaciones.....	52
9.3.3. Análisis de proliferación Ag-específica de linfocitos T.....	53
9.4. Estudios in vivo del efecto de dirigir Ag a los receptores Sn, CD163 y TLR2.....	53
9.4.1. Modelo experimental.....	53
9.4.2. Inmunizaciones.....	54
9.4.3. Análisis de proliferación Ag-específica de linfocitos T.....	54
9.4.4. Estudio de la respuesta humoral.....	54
10. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE scFv.....	56
10.1. Producción de los scFv.....	56
10.1.1. Extracción de RNA total.....	56
10.1.2. Obtención de cDNA.....	56
10.1.3. Clonación de los segmentos de cDNA que codifican los dominios VH y VL de los AcMo.....	56
10.1.4. Obtención de las construcciones que codifican los scFv de los AcMos unidas al gen gfp.....	58
10.1.5. Obtención de las secuencias que codifican los scFv de los AcMos unidas al ORF7 del virus del SRRP.....	61
10.1.6. Análisis de los productos de PCR.....	63
10.1.7. Aislamiento de DNA desde agarosa.....	63

10.1.8.	Plásmidos.....	64
10.1.9.	Digestión.....	65
10.1.10.	Ligación.....	66
10.1.11.	Transformación de bacterias competentes...	66
10.1.12.	Selección de colonias.....	66
10.1.13.	Extracción y purificación de plásmidos.....	67
10.1.14.	Secuenciación.....	68
10.2.	Generación de líneas celulares estables para la producción de proteínas recombinantes.....	68
10.3.	Western Blot.....	69
10.4.	Funcionalidad y especificidad de los scFv.....	70
10.5.	Marcaje de secciones de tejidos con las construcciones scFvGFP.....	71
10.6.	Endocitosis de los scFv unidos a GFP.....	72
11.	Estudio in vivo del efecto de dirigir Ag a la Sn en un modelo de inmunización con DNA.....	72
11.1.	Modelo experimental.....	72
11.2.	Inmunizaciones.....	73
11.3.	Análisis de proliferación Ag-específica de linfocitos T.	
11.4.	Estudio de la respuesta humoral.....	73
12.	ESTADÍSTICA.....	74
RESULTADOS.....		75
RECEPTORES Sn, CD163 Y TLR2 COMO DIANAS A LAS QUE DIRIGIR Ag PARA AUMENTAR SU INMUNOGENEICIDAD.....		75
1.	Análisis del patrón de expresión y de la capacidad endocítica de las moléculas Sn, CD163 y TLR2.....	75
1.1.	Patrón de expresión.....	75
1.2.	Regulación de Sn por citoquinas.....	76
2.	Distribución de los receptores Sn, CD163 y TLR2 en órganos linfoides secundarios.....	78
2.1.	Inmunohistoquímica.....	78
2.2.	Inmunofluorescencia.....	79
2.2.1.	Ganglio linfático.....	79
2.2.2.	Bazo.....	81
3.	Estudio fenotípico de las poblaciones celulares Sn+ y CD163+ presentes en órganos linfoides secundarios mediante citometría de flujo.....	83
3.1.	Ganglio linfático.....	83
3.2.	Bazo.....	86
4.	Estudio de la capacidad de endocitosis de los receptores Sn, CD163 y TLR2.....	88
5.	Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad de los AcMos anti Sn, CD163 y TLR2 de dirigir Ag a las APCs.....	92

6.	Evaluación in vivo del potencial de los AcMos Anti-Sn, Anti-CD163 y Anti-TLR2 para actuar como vectores para dirigir Ag.....	96
6.1.	Respuesta humoral.....	96
6.2.	Respuesta linfoproliferativa Ag-específica.....	109
MOLÉCULAS scFv COMO VECTORES VACUNALES EN UN MODELO DE INMUNIZACIÓN CON DNA.....		111
7.	Obtención de las proteínas recombinantes scFv anti-Sn y scFv anti-CD163 fusionadas a GFP.....	111
7.1.	Generación de las construcciones génicas scFv unidas a gfp.....	111
7.2.	Expresión de las proteínas recombinantes scFv fusionadas a GFP.....	120
7.3.	Capacidad de unión a su receptor del scFv 2A10 GFP y del scFv 3B11 GFP.....	123
7.4.	Marcaje en tejidos del scFv 2A10 y del scFv 3B11 unidos a GFP.....	125
7.5.	Endocitosis de los scFv unidos a GFP.....	127
8.	Generación de las moléculas scFv unidas a la proteína N del virus del SRRP.....	130
8.1.	Construcción de los plásmidos que codifican los scFv unidos a la proteína N del SRRP.....	130
8.2.	Expresión de las proteínas recombinantes scFv unidas a la Proteína N del virus del SRRP.....	132
8.3.	Capacidad de unión al receptor de las proteínas recombinantes scFv unidas a la Proteína N del virus del SRRP.....	135
9.	Evaluación de la capacidad de los scFv para mejorar la inmunogenicidad en un modelo de vacunación de DNA.....	138
DISCUSIÓN.....		142
CONCLUSIONES.....		165
BIBLIOGRAFÍA.....		167
PUBLICACIONES.....		193

INTRODUCCIÓN

1. GÉNESIS DE LA RESPUESTA INMUNE.

La eficacia de una vacuna depende de su capacidad para desencadenar una respuesta inmune protectora frente a un determinado patógeno. Para ello es necesario que se produzca la captación del antígeno (Ag) por parte de las células presentadoras de Ag (APCs), su procesamiento y presentación a los linfocitos.

1.1. Células presentadoras de Ag.

1.1.1. Células dendríticas (DCs).

Las DCs son uno de los principales tipos celulares responsables de la captación del Ag en la zona de infección o inoculación con una gran capacidad para presentar el Ag y primar a las células T vírgenes. Las DCs expresan una gran variedad de receptores especializados en el reconocimiento de estructuras moleculares conservadas que aparecen en gran parte de los microorganismos, denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *Pathogen-associated molecular patterns*). La variada expresión de algunos de estos receptores como los receptores de la familia de las lectinas tipo C o los receptores tipo *Toll* y de otras familias de receptores como los receptores Fc o los receptores *scavenger*, les convierte en una población celular muy heterogénea con capacidad para reconocer e internalizar diferentes tipos de patógenos (revisado en Steinman and Idoyaga, 2010). Así, la molécula BDCA-2, una lectina de tipo C, se expresa exclusivamente en la subpoblación de DCs convencionales (Dzionek et al., 2001) mientras que el receptor CLEC9A se expresa de forma selectiva en las DCs CD8 α ⁺ de ratón y en su equivalente en humanos (Caminschi et al., 2008; Huysamen et al., 2008; Sancho et al., 2008).

Además, la localización de las DCs inmaduras en las zonas de entrada de los patógenos, tales como la superficie de las mucosas y la dermis, les permite una rápida interacción con los microorganismos, la cual conlleva la activación de la célula y el procesamiento de los mismos. Es necesario que la captación del Ag aparezca acompañada de una señal de activación, ya que en caso contrario se induce tolerancia frente al mismo. En este sentido se ha comprobado que cuando se dirige el Ag *in vivo* al receptor endocítico DEC-205 en ausencia de adyuvante no se induce la activación de las células

T, mientras que, cuando la inmunización se combina con un AcMo anti-CD40, aumenta la expresión de las moléculas co-estimuladoras en las DCs, previniéndose la inducción de tolerancia y produciéndose la activación prolongada de las células T (Bonifaz et al., 2002; Hawiger et al., 2001).

Otra característica esencial de la biología de las DCs es su capacidad migratoria en respuesta a gradientes de quimioquinas. Tras la captura del Ag por parte de las DCs inmaduras, éstas inician un proceso de maduración que lleva asociado diversos cambios en la expresión de algunos de sus receptores de membrana. Así, mientras que disminuyen la expresión de CCR1 y CCR5, receptores de quimioquinas inflamatorias como CCL3 y CCL5, adquieren la expresión de CCR7, receptor de las quimioquinas CCL19 y CCL21 (revisado en Banchereau et al., 2000), que les confiere movilidad hacia las áreas T de los órganos linfoides secundarios, donde se encuentran con los linfocitos T vírgenes que expresan el receptor específico para el Ag. Además, comienzan a expresar altos niveles de moléculas co-estimuladoras, tales como CD58, CD86, CD80 y CD40, lo que las capacita para activar de manera eficiente a estos linfocitos (Ver figura 1; (Abbas et al., 1999)). Estudios recientes han demostrado que estas células pueden seguir capturando y presentando Ag, aunque después de madurar disminuye en gran medida el número de receptores de fagocitosis y endocitosis presentes en su membrana (Drutman and Trombetta, 2010).

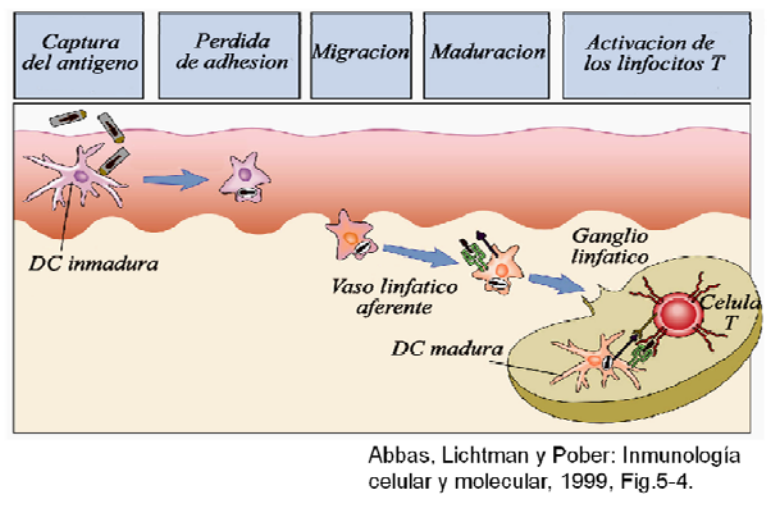


Figura 1. Las DCs presentes en los tejidos capturan el Ag y migran hacia los ganglios linfáticos donde presentan el Ag procesado a los linfocitos T.

Otro nivel de especialización que muestran algunas subpoblaciones de DCs es su capacidad intrínseca para presentar los Ags exógenos, además de unidos a moléculas MHC-II, asociados a moléculas MHC-I, lo cual supone una propiedad esencial para primar la respuesta antiviral y antitumoral. En este sentido, se han caracterizado varios tipos de DCs que procesan de distinta manera los Ags (Dudziak et al., 2007). En ratón, las DCs $CD8\alpha^-$ presentan de manera más eficiente los Ags asociados a moléculas MHC-II, mientras que las DCs $CD8\alpha^+$ están especializadas en la presentación cruzada de Ags (den Haan et al., 2000; Pooley et al., 2001; Schnorrer et al., 2006) y producen altos niveles de IL-12 una vez activadas (Hochrein et al., 2001; Reis e Sousa et al., 1997), por lo que juegan un papel muy importante en la resistencia frente a las infecciones virales.

Las DCs también pueden presentar el Ag no procesado a los linfocitos B. Estas células, tras captar el Ag en los tejidos periféricos, pueden mantenerlo en su superficie, migrar a los ganglios linfáticos y presentarlo a las células B vírgenes (Bergtold et al., 2005; Delamarre et al., 2005; Wykes et al., 1998), dando lugar a la activación de las mismas (Banchereau et al., 2000; MacLennan and Vinuesa, 2002). Estas DCs, cargadas con el Ag, se localizan en la región extrafolicular, próximas a las vénulas del endotelio alto de los ganglios linfáticos. Las células B se encontrarían con estas DCs tras su llegada a través de dichas vénulas y antes de migrar hacia los folículos (revisado en Carrasco, 2008).

De acuerdo con su diferente localización y sus funciones especializadas, se han caracterizado varias subpoblaciones de DCs. Las DCs convencionales (cDCs) incluyen a las DCs inflamatorias, que proceden de los monocitos inflamatorios y que no están presentes en estado de reposo (Naik et al., 2006), las DCs migratorias, que captan el Ag desde los tejidos periféricos y migran hacia los ganglios linfáticos a través de la linfa para interactuar con los linfocitos T (revisado en Allan et al., 2003; Allan et al., 2006; Reis e Sousa, 2006) y las DCs residentes, las cuales llegan en forma de precursores desde la sangre y llevan a cabo sus funciones en los tejidos (Grouard et al., 1997; Naik et al., 2003; Naik et al., 2006). Además existe una subpoblación denominada DCs plasmocitoides (pDCs), que se caracterizan por producir altas cantidades de IFN- α (Liu, 2005). Aunque este tipo celular no presenta una gran capacidad para estimular a las

células T (Ito et al., 1999; Steinman, 2003), su capacidad para producir IFN- α les permite desencadenar de manera más eficiente la respuesta antiviral (Cervantes-Barragan et al., 2007; Fitzgerald-Bocarsly and Feng, 2007).

La clasificación descrita anteriormente es sólo una de las que pueden encontrarse en la bibliografía ya que la terminología empleada para describir a estas células es en gran medida dependiente de los marcadores empleados en cada estudio, que a su vez dependen de la especie en la que se haya realizado. Un problema adicional para llevar a cabo la caracterización de las DCs es su plasticidad (Manickasingham et al., 2003; Zou and Tam, 2002), ya que probablemente son células que están cambiando constantemente tanto de fenotipo como de capacidades funcionales. Otro factor a tener en cuenta es que son células con una gran capacidad migratoria que pueden encontrarse en diferentes tejidos (Gunn, 2003), que existen en diferentes estados de maduración y que pueden proceder de linajes diferentes. Todos estos parámetros añaden una mayor complejidad a su estudio. Todo lo expuesto anteriormente refuerza la necesidad de llevar a cabo la caracterización de las DCs en la especie de interés, ya que no todos los datos obtenidos a partir del modelo de ratón pueden extrapolarse a otras especies.

Cuando se caracterizaron las DCs porcinas presentes en los órganos linfoides secundarios, se detectaron dos subpoblaciones, una con un fenotipo CD172a⁺CD4⁻CD11R1⁺, que se correspondería posiblemente con las cDCs, y otra que muestra una expresión constitutiva de IFN- α en las áreas T, definida como CD172a^{bajo}CD4⁺CD11R1⁻ que incluiría a las pDCs (Jamin et al., 2006). En sangre, los precursores de las cDCs porcinas, que han sido identificados como células CD172a⁺CD4⁻CD14⁻SLA-II⁺CD80/86⁺, presentan una alta capacidad de estimulación de las células T (Summerfield et al., 2003). Las pDCs sanguíneas porcinas, que cuando se incuban *in vitro* con el virus de la gastroenteritis transmisible son capaces de producir IFN- α , se han definido como CD172a^{bajo} CD4^{alto} (Charley and Lavenant, 1990; Summerfield et al., 2003).

Además, se ha estudiado el fenotipo y distribución de las DCs en diferentes tejidos localizados en las mucosas porcinas. Haverson et al mostraron la co-expresión de CD16 y SLA-II en las DCs de la lámina propia,

que son, en su mayoría, CD172a⁺ (Haverson et al., 2000). Otro marcador importante para distinguir las DCs intestinales porcinas es el CD11R1 ya que todas las DCs capaces de migrar desde el intestino vía vasos linfáticos expresaban dicho marcador (Bimczok et al., 2005). CD11R1 también se expresa en la mayoría de las DCs CD16⁺ de la lámina propia (Bimczok et al., 2006; Haverson et al., 2000). Estas DCs aparecen localizadas en las proximidades de las células M, las cuales podrían transferirles los Ags lumenales; además, también podrían captar dichos Ags emitiendo prolongaciones citoplasmáticas entre las células epiteliales (Bimczok et al., 2006). Finalmente, en la mucosa asociada a la tráquea se ha identificado una población de DCs que forma una densa red por debajo y dentro del epitelio respiratorio y que serían CD16⁺CD11R1⁻CD172a⁻, mostrando una expresión de marcadores diferente a las DCs del tracto intestinal (Bimczok et al., 2006).

1.1.2. Macrófagos.

Aunque durante mucho tiempo el paradigma de APC ha sido la DC, algunos datos obtenidos *in vitro* en los años noventa sugerían que los macrófagos podrían estar involucrados en la adquisición de los Ags y su presentación a los linfocitos T CD4⁺ (Hsieh et al., 1993a; Hsieh et al., 1993b; Nair et al., 1995) y CD8⁺ (Kovacsovics-Bankowski and Rock, 1994; Rock et al., 1993). La aplicación en el modelo de ratón de nuevas técnicas de imagen (Cahalan et al., 2002; Germain et al., 2006), en especial de la microscopía intravital, han confirmado el papel como APCs de los macrófagos en la iniciación de la respuesta inmune.

En los órganos linfoides secundarios existen diferentes subpoblaciones de macrófagos en las zonas de entrada de Ag que han sido caracterizadas de acuerdo a algunos de sus receptores de superficie. Debido a su localización, estos macrófagos logran concentrar el Ag cerca de los linfocitos facilitando la iniciación de la respuesta inmune adaptativa (revisado en Junt et al., 2008). Los macrófagos que expresan el marcador SIGNR1, una lectina tipo C, aparecen localizados en el área más externa de la zona marginal del bazo y en la zona medular de los ganglios linfáticos y son capaces de unir Ags polisacáridos. Se ha demostrado que participan en la captura del *Streptococcus pneumoniae* desde la sangre y en la iniciación de

la producción temprana de la IgM necesaria para la protección frente a dicha bacteria. Los macrófagos MARCO⁺ (*Macrophage receptor with collagenous structure*), aparecen en el anillo más externo de la zona marginal y en el seno subcapsular (SCS) y participan en la captura de patógenos como *Streptococcus aureus*, *Escherichia coli* y algunas micobacterias y se les ha relacionado con la generación de las respuestas B T-independientes (Chen et al., 2005). La tercera subpoblación caracterizada, los macrófagos Sn⁺, se localizan en la zona interna del seno marginal del bazo y en el SCS de los ganglios linfáticos (Berney et al., 1999; Hartnell et al., 2001; Oetke et al., 2006) y utilizan varias estrategias para capturar Ag, ya que unen patógenos que presenten glicoproteínas en su superficie así como también Ags opsonizados (revisado en Crocker et al., 2007) (Ver figura 2).

A diferencia de las dos subpoblaciones anteriormente citadas, cuya función principal sería la fagocitosis de diferentes patógenos, los macrófagos Sn⁺ tienen un papel importante en la iniciación de la respuesta inmune a través de la presentación de Ags a los linfocitos. Estos macrófagos Sn⁺ se han implicado en la captación de diferentes virus, y en su presentación en forma nativa a las células B foliculares, iniciando de esta manera la respuesta humoral (Junt et al., 2007). La transferencia de Ag a los folículos por parte de estas células no se limita a partículas víricas inactivadas. Carrasco (2007) y Phan (2007) han mostrado que los macrófagos subcapsulares Sn⁺ presentan también Ags particulados y en forma de inmunocomplejos a las células B, que estas últimas transportan mediante su interacción con receptores del complemento de tipo 1 y 2 y los transfieren a las células foliculares dendríticas (Carrasco and Batista, 2007; Phan et al., 2007), las cuales participan en el proceso de selección y maduración de las células B (Phan et al., 2009).

Se ha descrito que los macrófagos Sn⁺ del SCS presentan una capacidad fagocítica reducida y bajos niveles de enzimas lisosomales (Phan et al., 2009), y que estas células son capaces de internalizar Ags lipídicos y presentarlos asociados a CD1d a las células iNKT (Barral et al., 2010). Así mismo, endocitan el virus *Influenza*, impidiendo su diseminación a otros tejidos (Gonzalez et al., 2010). Respecto a su papel en la presentación de Ags a las células T, las células Sn⁺ presentes en los ganglios linfáticos y en

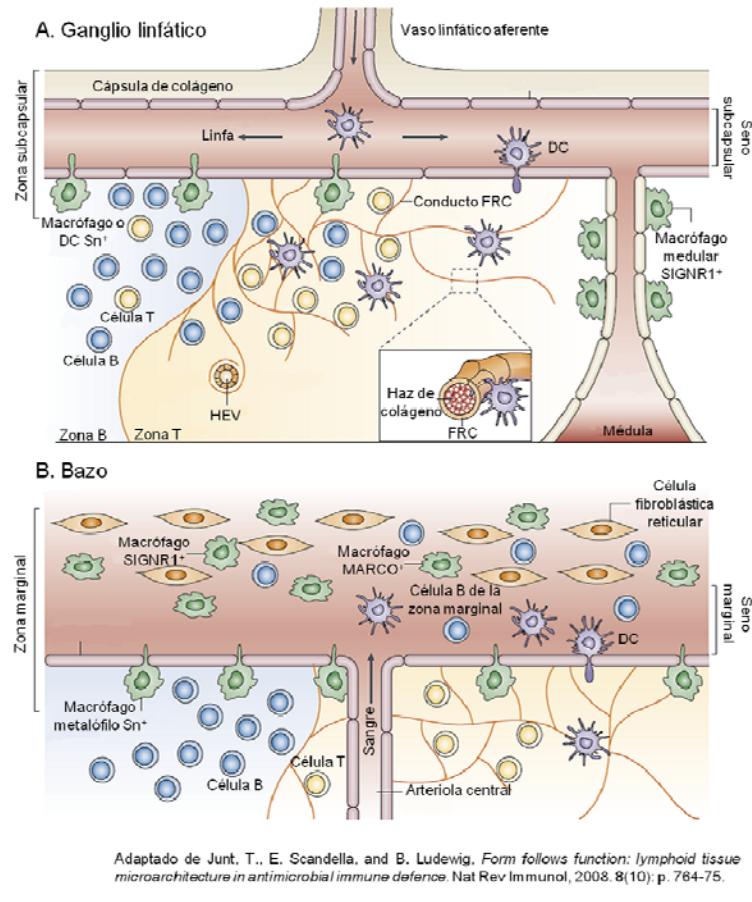


Figura 2. Microestructura de las zonas de captura de Ag del ganglio linfático y del bazo. A. Representación esquemática de la zona subcapsular del ganglio linfático. Los Ags llegan al ganglio, a través del vaso linfático aferente, libres o transportados por las DCs que se dirigen hasta la zona T. Los patógenos libres son capturados por los macrófagos Sn^+ del SCS. **B.** Representación esquemática de la zona marginal. Los Ags derivados de patógenos llegan a la zona marginal a través de la sangre libres o transportados por las DCs. Estos Ags pueden ser captados por las DCs y las células B de la zona marginal o, según las características de la superficie de estos patógenos, por los macrófagos Sn^+ o los macrófagos de la zona marginal SIGNR1^+ o MARCO^+ .

el bazo son capaces de captar Ag y presentar péptidos derivados del mismo a las células T induciendo su activación (Berney et al., 1999; Muerkoster et al., 1999; Umansky et al., 1996). Además, recientemente se ha descrito que los macrófagos Sn^+ del bazo son capaces de captar el Ag y transferirlo a las DCs localizadas en sus proximidades, participando de esta manera en

la activación de las células T CD8⁺ (Backer et al., 2010). En los ganglios linfáticos también se han involucrado a los macrófagos Sn⁺ en la presentación cruzada de Ags tumorales a las células T CD8⁺ que captarían mediante la fagocitosis de células tumorales muertas (Asano et al., 2010).

1.1.3. Monocitos.

Los monocitos constituyen una población heterogénea que juega un papel importante en la generación de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa. Los monocitos se diferencian a partir de precursores procedentes de la médula ósea que pasan al torrente circulatorio y migran a los tejidos donde se diferencian a macrófagos tisulares (Volkman and Gowans, 1965). Además, los monocitos también pueden diferenciarse *in vivo* a DCs. En un modelo de infección con *Leishmania major* en el ratón, se observó una llegada masiva de monocitos al lugar de inoculación, que se diferenciaban a DCs y posteriormente migraban a los ganglios linfáticos donde eran capaces de presentar Ags a las células T vírgenes, generando una respuesta protectora T_H1 (Leon et al., 2007). Más recientemente se ha descrito que las DCs CD103⁻CD11b⁺CX3CR1⁺ de la lámina propia se originan a partir de los monocitos Ly6C^{alto} (Bogunovic et al., 2009; Varol et al., 2009). También los monocitos Ly6C^{bajo} pueden diferenciarse a DC, si bien se ha sugerido que estas estarían implicadas en la inducción de tolerancia a los linfocitos T mediante un mecanismo que implicaría la transmisión de señales reguladoras a través de PDL1 (Peng et al., 2009). Por lo tanto, la importancia del monocito no sólo es debida a su capacidad para captar, procesar y presentar el Ag a los linfocitos T, sino también como precursor de DCs y macrófagos que a su vez son capaces de actuar como APCs.

La heterogeneidad de estas células ha sido descrita en diferentes especies mediante la combinación de diversos marcadores. En la especie humana se han caracterizado diferentes subpoblaciones en función de su expresión de CD14 y CD16: los monocitos CD14^{alto}CD16⁻ conocidos como clásicos representan la mayoría de estas células, mientras que los CD14⁺CD16⁺ solo comprenden un 10% de los monocitos y muestran un fenotipo más maduro y muy similar a los macrófagos tisulares (Passlick et al., 1989; Ziegler-Heitbrock et al., 1993). Respecto a su funcionalidad, los CD14^{alto}CD16⁻ tienen una alta capacidad fagocítica y son capaces de

producir $\text{TNF}\alpha$ e IL-10 por lo que se les ha asignado una función antiinflamatoria, mientras que los $\text{CD14}^+\text{CD16}^+$ se caracterizan por su potencial para actuar como células presentadoras de Ag y producir grandes cantidades de $\text{TNF}\alpha$ y poco o no nada de IL-10 por lo que se les ha asociado al desarrollo de procesos inflamatorios (Frankenberger et al., 1996; Ziegler-Heitbrock, 1996). Al cruzar la expresión de CD64 con CD14 y CD16 se identificaron tres subpoblaciones: los clásicos $\text{CD14}^{\text{alto}}\text{CD16}^-\text{CD64}^+$ y los $\text{CD14}^+\text{CD16}^+\text{CD64}^+$ que muestran una alta capacidad fagocítica, producen grandes cantidades de IL-1, IL-6 y $\text{TNF}\alpha$ y que al igual que los $\text{CD14}^+\text{CD16}^+\text{CD64}^-$ presentan una mayor capacidad de estimular a las células T en cultivo mixto linfocitario que los monocitos clásicos (Grage-Griebenow et al., 2001a; Grage-Griebenow et al., 2001b). La diferente expresión de los receptores de quimioquinas CCR2 y CX3CR1 determina en gran medida la capacidad de estas células para migrar a diferentes localizaciones durante la respuesta inmune. Así, la expresión de CCR2 es importante para que tenga lugar su reclutamiento hacia los tejidos inflamados (revisado por Serbina et al., 2008). Los monocitos $\text{CD14}^{\text{alto}}\text{CD16}^-$ expresan niveles altos de CCR2, bajos de CX3CR1 y son CD62L^+ mientras que los $\text{CD14}^+\text{CD16}^+$ expresan niveles bajos de CCR2, altos de CX3CR1 y son CD62L^- (Geissmann et al., 2003; Tacke and Randolph, 2006).

En el ratón se han caracterizado diferentes subpoblaciones de monocitos en función de la expresión de Ly6C, CCR2 y CX3CR1. En este caso se han identificado los monocitos $\text{Ly6C}^{\text{alto}}\text{CX3CR1}^{\text{bajo}}\text{CCR2}^+\text{CD62L}^+$ y los $\text{Ly6C}^{\text{bajo}}\text{CX3CR1}^{\text{alto}}\text{CCR2}^-\text{CD62L}^-$ que se corresponderían a los clásicos y los proinflamatorios humanos respectivamente (Geissmann et al., 2003; Nahrendorf et al., 2007; Sunderkotter et al., 2004). Todos los monocitos porcinos, a diferencia de los humanos, expresan CD16 por lo que esta molécula no puede emplearse para estudiar su heterogeneidad (Chamorro et al., 2000). Su estudio se ha llevado de acuerdo a la expresión de CD163 identificándose dos subpoblaciones. Los monocitos CD163^+ expresan niveles bajos de CD14 y altos de moléculas de SLA-II, de moléculas coestimuladoras y de adhesión asemejándose a los $\text{CD14}^+\text{CD16}^+$ humanos (Chamorro et al., 2000; Sanchez et al., 1999). Así mismo expresan niveles más altos de CX3CR1 y más bajos de CCR2 que los monocitos CD163^- (Moreno et al., 2010). Además al igual que sus homólogos humanos los

monocitos CD163⁺ producen grandes cantidades de TNF α y pequeñas de IL-10 y tienen un alto potencial para actuar como APCs. Por el contrario los monocitos CD163⁻ comparten características con los monocitos humanos CD14⁺CD16⁻ (Chamorro et al., 2005; Sanchez et al., 1999).

Finalmente, los monocitos porcinos, al igual que los humanos y los de ratón, pueden diferenciarse *in vitro* a macrófagos mediante su cultivo con suero o M-CSF y a MoDC (células dendríticas derivadas de monocitos) con GM-CSF más IL4 (Chamorro et al., 2000; Chamorro et al., 2004). Al igual que los monocitos CD14⁺CD16⁺ humanos, los monocitos CD163⁺ porcinos son capaces de diferenciarse *in vitro* a MoDCs, las cuales presentan una gran capacidad para actuar como APCs (Chamorro et al., 2004; de Baey et al., 2001).

1.2. Activación de los linfocitos T y B.

Para que se desencadene de manera apropiada la respuesta inmune frente a un determinado patógeno, es necesario que se produzca la activación de los linfocitos T y B en los órganos linfoides secundarios. Las DCs migratorias, procedentes de las zonas de inoculación o de entrada del Ag, lo transportan a los órganos linfoides secundarios y lo presentan procesado a las células T y en forma nativa a las células B (Delamarre et al., 2005; Wykes et al., 1998). Además los Ags pueden difundir pasivamente desde los tejidos a los órganos linfoides secundarios a través de la linfa o de la sangre y drenar dentro del SCS o de la zona marginal, donde son captados por las DCs y los macrófagos, que los transfieren a las células B o a las DCs localizadas en la zona folicular (Carrasco and Batista, 2007; Junt et al., 2007; Phan et al., 2007).

La presentación del Ag por parte de las APCs a los linfocitos T cooperadores (T_H) induce su activación, su expansión clonal y su diferenciación hacia linfocitos efectores y linfocitos de memoria (Garcia et al., 1999; Jenkins et al., 2001), que abandonan los órganos linfoides secundarios para dirigirse a la zona de infección o inflamación, y proceden a la eliminación del Ag. Además, dichas células expresan moléculas de membrana y secretan citoquinas que son necesarias para que tenga lugar la activación de los linfocitos B y los linfocitos T citotóxicos o CD8⁺. (revisado en McKinstry et al., 2010).

Los linfocitos T_H constituyen una población heterogénea, tanto fenotípica como funcionalmente (Openshaw et al., 1995; Zhou et al., 2009), habiéndose definido diferentes subpoblaciones de los mismos. La polarización funcional de las células $T\ CD4^+$ depende en gran medida de las citoquinas predominantes en la zona de iniciación de la respuesta, que a su vez depende del tipo de patógeno. Las subpoblaciones de células T_H mejor caracterizadas son las T_{H1} y T_{H2} , siendo la IL-12 la principal citoquina inductora de células T_{H1} y la IL-4 de células T_{H2} . La función de los linfocitos T_{H1} y T_{H2} es la defensa frente a patógenos intracelulares o extracelulares respectivamente (Paul and Seder, 1994). También se han descrito otras subpoblaciones de células T_H que incluyen a las células T_{H17} , que participan en la respuesta inmune frente a bacterias, hongos y en el desarrollo de reacciones autoinmunes; las T_H foliculares, que son las responsables de transmitir a las células B vírgenes las señales necesarias para que tenga lugar su activación y las células T reguladoras (T_{reg}) que intervienen en la supresión de la respuesta inmune (Fazilleau et al., 2009; Shevach, 2006; Stockinger and Veldhoen, 2007).

Respecto a la generación de la respuesta humoral, una vez que las células T_H y B encuentran el Ag, ambos tipos celulares se dirigen hacia el borde del folículo primario (Garside et al., 1998; Jacob et al., 1991a; Liu et al., 1991) donde interaccionan y se activan completamente (Okada et al., 2005) comenzando a formarse pequeños focos de linfocitos B que comienzan a proliferar. Algunos de estos linfocitos B se diferencian a células plasmáticas de vida media corta (Jacob and Kelsoe, 1992) mientras que el resto de los linfocitos B migran al centro del folículo donde proliferan, produciéndose una rápida expansión clonal que conduce a la formación del folículo linfoide secundario. Dicho folículo se polariza en una zona clara, rica en DC foliculares (FDC) y macrófagos (MacLennan, 1994), estratégicamente posicionada hacia la zona de entrada de Ags (Millikin, 1966).y en una zona basal, oscura, más próxima a la zona rica en células T, formada por los clones de linfocitos B que están proliferando (centro germinal) (Jacob et al., 1991a; Liu et al., 1991). Los linfocitos B activados diversifican sus BCRs (receptor de células B, del inglés *B cell receptor*), en un proceso conocido como maduración de la afinidad (Berek et al., 1991), y pueden cambiar el isotipo de la cadena pesada (Berek et al., 1991; Jacob et al., 1991b)

dirigiéndose posteriormente hacia la zona clara (Allen et al., 2007b; Hauser et al., 2007; MacLennan, 1994) (Schwickert et al., 2007) donde las DCs foliculares les presentan el Ag (Chen et al., 1978) . Si la afinidad del BCR por el Ag es baja, la célula B entra en muerte celular programada y es fagocitada por los macrófagos residentes (Allen et al., 2007b), mientras que si la afinidad es alta se produce una selección positiva.

En el proceso de selección positiva de las células B intervienen también las células T_H que aportan las señales de supervivencia necesarias para rescatar a las células B con un BCR de alta afinidad de los fenómenos de apoptosis (Allen et al., 2007b).

Una vez que los linfocitos B han proliferado y madurado en los centros germinales pueden volver a entrar a la zona oscura, expandirse e iniciarse de nuevo el proceso de selección de BCRs o diferenciarse a linfocitos B de memoria o a células plasmáticas productoras de anticuerpos. Los linfocitos B de memoria pueden pasar al torrente circulatorio y recircularizar por los órganos linfoides, siendo los responsables de la respuesta inmune secundaria (Allen et al., 2007b; Hauser et al., 2007; Kelsoe, 1996) (Schwickert et al., 2007) (revisado en Allen et al., 2007a; McHeyzer-Williams and McHeyzer-Williams, 2005; McHeyzer-Williams et al., 2009) (Ver Figura 3).

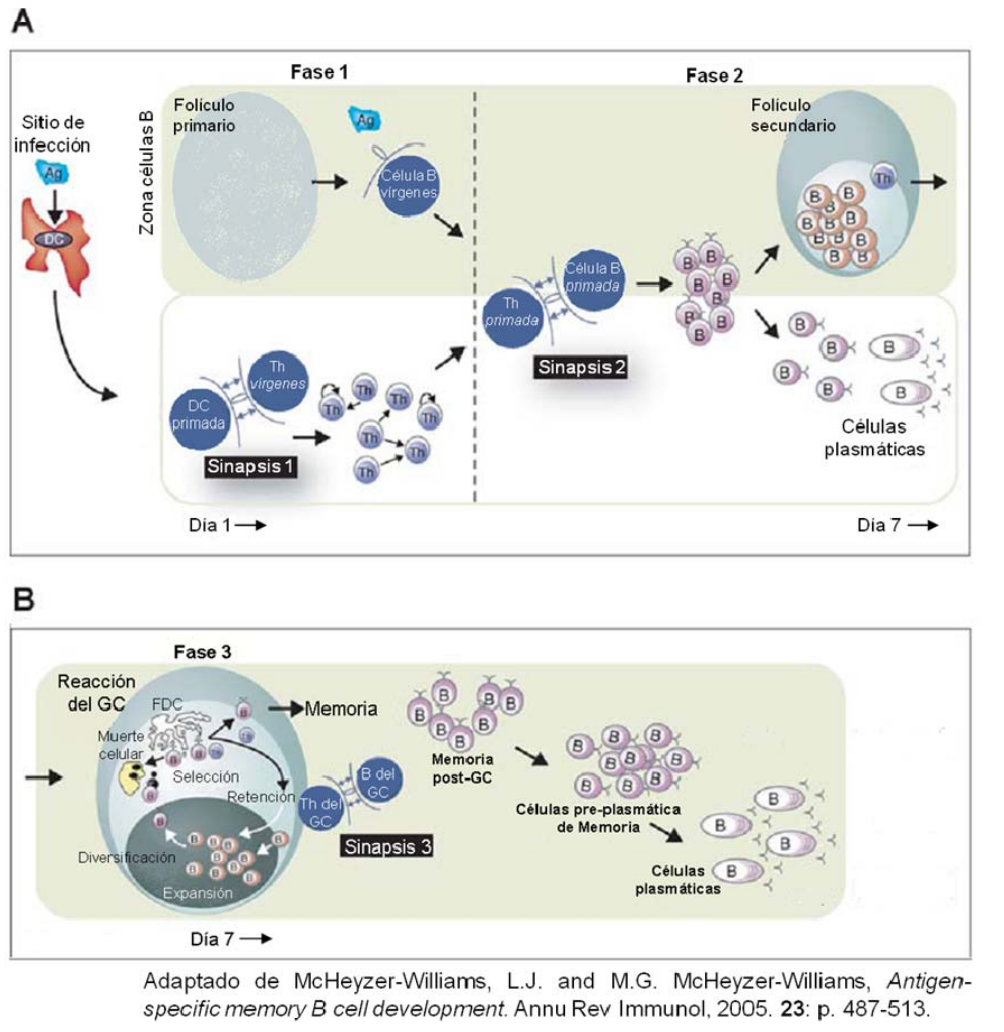


Figura 3. Activación de los linfocitos T y B en los órganos linfoides secundarios. Fase 1. Desarrollo de células T_H efectoras. Captura del Ag en forma nativa por las células B y presentación antigénica y activación de los linfocitos T vírgenes (Sinapsis 1) y generación y expansión clonal de los linfocitos T_H efectoras. **Fase 2. Desarrollo de células B efectoras.** Interacción de los linfocitos T y B primados frente a un Ag (Sinapsis 2) y desarrollo de células B plasmáticas de vida media corta y del centro germinal. **Fase 3. Actividad del centro germinal (GC).** Desarrollo de células B de memoria e interacción entre linfocitos T_H y B del centro germinal (Sinapsis 3) para regular la salida de las células B del mismo. Expansión y diferenciación hacia células B de memoria y células plasmáticas de vida media larga.

La regulación en el cambio de isotipo de los anticuerpos parece estar determinada por las citoquinas derivadas de las células CD4 T_H1 y T_H2. En cerdo, los isotipos mayoritarios que se generan en una respuesta T_H1 o T_H2 son IgG₂ e IgG₁ respectivamente. Estudios *in vitro* han demostrado que el IFN- γ y la IL12 promueven la producción del isotipo IgG₂, que ha sido relacionado con una respuesta T_H1. Mientras, la IL-10 estimula una mayor producción del isotipo IgG₁, asociada con la presencia de células T_H2 (Crawley et al., 2003; Crawley and Wilkie, 2003).

2. ESTRATEGIAS PARA GENERAR VACUNAS MÁS EFECTIVAS QUE TIENEN COMO DIANA LAS APCs.

La disponibilidad de vacunas es fundamental en la prevención y control de enfermedades infecciosas tanto en sanidad humana como animal. La mayoría de las vacunas empleadas en sanidad animal pertenecen a las denominadas clásicas, es decir, vacunas basadas en el empleo de patógenos inactivados o atenuados. Las vacunas inactivadas son buenas inductoras de inmunidad humoral, pero generalmente no generan una buena respuesta celular, y las vacunas basadas en patógenos atenuados son efectivas en la inducción de inmunidad celular pero presentan riesgos en su empleo ya que existe la posibilidad de reversión a formas virulentas y/o escapes (Cox et al., 2004; Ogra et al., 1991; Weeks-Levy et al., 1991). Por ello, en los últimos años, se están investigando nuevas estrategias y métodos de vacunación que, a diferencia de las vacunas clásicas, emplean únicamente los componentes del patógeno relacionados con la inducción de protección, eliminando aquellas partes implicadas en los mecanismos de modulación de la respuesta inmune que permitirían la evasión del patógeno de los mecanismos de protección. Entre estos nuevos abordajes destacan las vacunas basadas en la utilización de proteínas recombinantes, péptidos, ácidos nucleicos, entre otras, las cuales se están evaluando con resultados prometedores fundamentalmente en el modelo de ratón. Sin embargo se ha encontrado que estas vacunas son menos inmunogénicas en animales de gran tamaño y en humanos, lo que es un obstáculo para su uso clínico y veterinario. Además, hay que puntualizar que muchas de estas vacunas diseñadas y probadas en ratón van dirigidas frente a patógenos que no infectan esta especie de forma natural, con lo que el éxito de una vacuna de

este tipo en ratón no lo garantiza en la especie susceptible a la infección. Estos problemas han llevado a que una de las áreas de mayor importancia en el desarrollo de vacunas de nueva generación sea aquella que tiene como objetivo el diseño de estrategias que potencien su inmunogenicidad.

Algunas de estas estrategias, que pueden combinarse entre sí, tienen como diana a las APCs. Entre estas estrategias destacarían aquellas cuyo objetivo es el reclutamiento de las APCs en la zona de inoculación del Ag, la maduración de dichas células o la mejora en la captación y/o procesamiento del Ag.

2.1. Reclutamiento de las APCs.

Se ha descrito que la co-administración del Ag con determinadas citoquinas o quimioquinas puede promover el incremento del número de DCs en los lugares de inoculación o de inicio de la respuesta inmune. La administración de Flt3-ligando (Flt3L) en el ratón incrementó la acumulación de DCs en varios tejidos, incluyendo el bazo, la médula ósea, los ganglios linfáticos y el hígado (Pulendran et al., 1997; Shurin et al., 1997). Estas DCs, procedentes de la médula ósea y del bazo, fueron capaces de actuar eficientemente como APCs en un cultivo mixto linfocitario (Shurin et al., 1997). En el mismo modelo, la administración de ovalbúmina junto con esta citoquina consiguió mejorar la respuesta Ag-específica de las células T y B y la producción de anticuerpos de isotipo IgG_{2b} (Pulendran et al., 1998). En otro trabajo, utilizando también el Flt3L, se consiguió incrementar la magnitud de la respuesta de las células T CD8⁺ frente al virus del Polioma en una infección con este virus (Drake et al., 2000). Además, la inmunización de ratones con una proteína de fusión que consta un dominio extracelular tirosin-quinasa del Flt3L y la gp120 del virus HIV o virus del Sida (Síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida), aumentó la frecuencia de células T CD8⁺ y el título de anticuerpos específicos frente a la gp120 cuando se comparó con la obtenida con la proteína sin fusionar (Sailaja et al., 2003).

MIP-1 α y RANTES son dos ejemplos entre otros de quimioquinas capaces de reclutar DCs y de actuar como adyuvantes mejorando la respuesta inmune frente a diferentes Ags (revisado por Kutzler and Weiner, 2004). La co-inoculación de MIP-1 α es capaz de reclutar DCs inmaduras en ratones, incrementando la respuesta Ag-específica humoral y celular

(McKay et al., 2004). Así mismo, la co-inmunización con RANTES incrementó significativamente la respuesta T CD4⁺ y CD8⁺, mejorando la supervivencia de ratones infectados con una dosis letal del virus herpes simple tipo 2 (Sin et al., 2000).

En el cerdo, la administración intradérmica de un plásmido con la secuencia del GM-CSF porcino incrementó de forma significativa el número de células de Langerhans y de otras DCs de la piel en el lugar de inoculación (Melkebeek et al., 2008). En la vacunación frente al virus de Aujeszky, la utilización de GM-CSF como adyuvante consiguió aumentar significativamente los títulos de IgG₁ e IgG₂ frente a las proteínas gB y gD del virus, así como también mejorar la protección frente a éste (Somasundaram et al., 1999). Sin embargo, cuando se utilizó esta citoquina para mejorar la vacuna de la Fiebre aftosa basada en la VP1 de este virus no se obtuvieron cambios significativos en la respuesta inmune (Cedillo-Barron et al., 2003).

2.2 Estimulación de las APCs.

La maduración y activación de las APCs induce la expresión de receptores de quimioquinas y de moléculas co-estimuladoras que, por un lado dirigen la migración de estas células hacia los órganos linfoides secundarios y por otro incrementan su capacidad de presentación antigénica. En este sentido, los ligandos o algunos AcMos específicos de los receptores tipo TLR y CD40, se consideran adyuvantes vacunales ya que las señales mediadas por estos receptores inducen la maduración de las APCs (Banchereau and Steinman, 1998; Boyle et al., 1998; Hertz et al., 2001; Medzhitov et al., 1997; Michelsen et al., 2001).

CD154 es el ligando del receptor CD40 y ha sido utilizado para promover la expresión de CD80/86 en las DCs (revisado en Banchereau and Steinman, 1998). En el cerdo, la co-administración de un plásmido que codificaba la proteína E2 del virus de la Peste porcina clásica junto con este ligando, mejoró la producción de anticuerpos neutralizantes y la protección frente al virus con respecto al Ag solo (Wienhold et al., 2005). Así mismo, la inmunización de ovejas con un plásmido que codificaba la gD del virus herpes bovino tipo 1 fusionada a CD154 desencadenó una respuesta humoral más rápida y potente que la obtenida en los animales inmunizados

con un plásmido que codificaba la gD sola (Manoj et al., 2003). En ratón también se ha utilizado un AcMo frente a este receptor para conseguir la activación de las DCs (Bonifaz et al., 2002).

De los receptores tipo *Toll*, el más estudiado como diana para mejorar la respuesta inmune es el TLR2. En estudios realizados en el ratón utilizando ligandos sintéticos como el BPPcysMPEG (Prajeeth et al., 2010), el Pam2Cys (Jackson et al., 2004) o el Palmitoil (Zhu et al., 2004) se ha observado un incremento de las respuestas humoral y celular frente a diferentes Ags.

Algunas citoquinas también son capaces de promover la maduración de determinados tipos de APCs. Así, la IL-3 y el GM-CSF inducen la diferenciación de los monocitos humanos a DCs (Suzuki et al., 2004), mejorando la presentación del Ag. En el cerdo, estas citoquinas favorecieron la inducción de una respuesta protectora frente al virus de la Peste porcina clásica al co-administrarlas con el plásmido que codifica la gp55 (Andrew et al., 2006).

2.3 Dirigir Ag a la superficie de las APCs.

Las APCs pueden captar los Ags mediante procesos no específicos como la micro o la macropinocitosis, o utilizando mecanismos más específicos como la endocitosis mediada por receptor (Paillot et al., 2001; Sallusto et al., 1995; Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Esta característica puede ser aprovechada para el diseño de vacunas más eficientes. Así, utilizando ligandos, AcMos o fragmentos procedentes de AcMos específicos de receptores expresados en la superficie de las APCs, fusionados al Ag, se puede facilitar su captura y/o procesamiento, mejorando su presentación a los linfocitos.

En el ratón se ha estudiado el potencial de diferentes receptores expresados en las DCs, los monocitos y/o los macrófagos para servir como dianas a las que dirigir el Ag. Hay que resaltar que los receptores estudiados pertenecen a familias que muestran una gran diversidad entre ellas tanto en sus patrones de expresión como en su funcionalidad. Así, se ha evaluado el efecto en la respuesta inmune de dirigir el Ag a moléculas de adhesión (Castro et al., 2008), moléculas co-estimuladoras (Boyle et al., 1998) (Deliyannis et al., 2000), Siglecs (Zhang et al., 2006), receptores tipo *Toll* (Jackson et al., 2004; Prajeeth et al., 2010; Zhu et al., 2004),

lectinas tipo C (Bonifaz et al., 2004; Demangel et al., 2005; He et al., 2007; McKenzie et al., 2007; Nchinda et al., 2008), receptores *scavenger* (Tagliani et al., 2008) o receptores Fc (Heijnen et al., 1996), entre otros. Bonifaz et al., utilizando un AcMo anti-DEC-205 fusionado a la ovalbúmina, consiguieron mejorar la respuesta celular, necesitando hasta 1000 veces menos cantidad del Ag para obtener los mismos niveles de linfoproliferación. En este mismo trabajo, se consiguió reducir el crecimiento de tumores que expresaban la ovalbúmina y proteger frente a la infección por un virus *Vaccinia* recombinante que expresaba esta misma proteína (Bonifaz et al., 2004). Así mismo, en el modelo de ratón se consiguió mejorar la respuesta humoral y la proliferativa de las células T CD4⁺ y CD8⁺ cuando se dirigió el Ag al receptor de manosa, que se expresa en algunas poblaciones de macrófagos y DCs tisulares, empleando un AcMo específico en ausencia de adyuvante. Además, la co-administración del AcMo fusionado a la ovalbúmina junto con CpGs como adyuvante indujo inmunidad antitumoral frente a tumores que expresaban dicha proteína (He et al., 2007). Más recientemente Clec-9A, otra lectina de tipo C expresada en una subpoblación de DCs sanguíneas, ha sido evaluada como receptor al que dirigir el Ag empleando un AcMo específico frente a ella, observándose un importante incremento en la respuesta humoral y celular en ausencia de adyuvante (Caminschi et al., 2008).

Dentro de los receptores *scavenger* analizados, cabe destacar el CD36, también expresado en las DCs CD8 α ⁺. Así, la inmunización de ratones con un AcMo anti-CD36 fusionado a la ovalbúmina indujo una importante activación de las células T CD4⁺ y CD8⁺, la producción de anticuerpos frente a la ovalbúmina y protegió frente al crecimiento de un tumor que expresaba dicha proteína (Tagliani et al., 2008).

También se ha conseguido incrementar la respuesta de las células T CD8⁺ Ag-específicas *in vivo* utilizando un AcMo frente al receptor Siglec H, que se expresa en los precursores de las pDCs de la médula ósea, el bazo, la sangre y los ganglios linfáticos (Zhang et al., 2006).

Los ejemplos descritos anteriormente son sólo una muestra del trabajo que se está realizando en esta área en el modelo de ratón. En células humanas, *in vitro*, dirigiendo el Ag mediante un AcMo frente a DC-SIGN, una lectina de tipo C, o a TLRs, expresados en APCs tales como DCs,

macrófagos o monocitos, se obtuvo una mejora en la respuesta proliferativa Ag-específica de las células T CD4⁺ que permitió reducir la cantidad del Ag en más de 100 veces con respecto al control (Schjetne et al., 2003; Tacken et al., 2005).

Aunque, como hemos mostrado, esta estrategia para mejorar la inmunogenicidad de vacunas, es muy prometedora, existen muy pocos trabajos que se hayan realizado en animales de interés ganadero. En oveja se consiguió mejorar la protección frente al *Corynebacterium pseudotuberculosis* inmunizando a estos animales con plásmidos que codificaban el CTLA-4, un ligando de la familia de moléculas B7 expresadas en las APCs, y una forma truncada de la fosfolipasa D de este patógeno (Chaplin et al., 1999). En esta misma especie, empleando una vacuna de DNA basada en el empleo de un plásmido que codificaba el CD154, ligando de CD40, fusionado a una forma truncada de la gD del virus Herpes bovino tipo I, se consiguió mejorar la respuesta de anticuerpos frente a dicha proteína con respecto a los animales control que recibieron sólo el plásmido que codificaba la proteína gD (Manoj et al., 2003). La inmunización de vacas con un plásmido codificante de la molécula CTLA4 fusionado al Ag bacteriano β -galactosidasa indujo, así mismo, una mejor respuesta tanto humoral como celular con respecto a la obtenida en los animales inoculados exclusivamente con el plásmido que codificaba el Ag (Shkreta et al., 2003). Finalmente, ya en la especie porcina, empleando de nuevo una vacuna tipo DNA se consiguió mejorar la respuesta humoral frente a la ovalbúmina inmunizando a estos animales con un plásmido que codificaba la molécula CTLA-4 fusionada a dicha proteína (Tachedjian et al., 2003).

2.3.1 Criterios a considerar en la selección de un receptor al que dirigir el Ag.

Es deseable que estos receptores tengan una expresión lo más restringida posible a las APCs, que sean endocíticos y que la internalización del Ag lleve a la presentación del mismo vía moléculas MHC.

2.3.1.1 Expresión restringida a las APCs.

Como se ha señalado anteriormente, sólo una pequeña parte del Ag inoculado es captado por las APCs. El empleo de vectores que lo dirijan a

receptores expresados en la superficie de dichas células actuaría por tanto, en primer lugar, mejorando la captura del mismo. En este sentido, los receptores diana deben mostrar una expresión lo más selectiva posible en las APCs para evitar su captura por otras células. Hay que señalar que actualmente no se conoce ningún receptor cuya expresión sea exclusiva de las APCs. Por otro lado hay que tener en cuenta la subpoblación de APC en la que se expresa dicho receptor, ya que se han observado diferencias en las vías de procesamiento y presentación antigénica entre diferentes subpoblaciones. Así, en el modelo de ratón, las DCs $CD8\alpha^+$ tienen mayor capacidad de presentar de manera cruzada el Ag que las $CD8\alpha^-$ (den Haan et al., 2000). Esto se ha relacionado con una mayor expresión de proteínas intracelulares implicadas en la presentación de péptidos asociados a moléculas MHC-I en las DCs $CD8\alpha^+$ que en las $CD8\alpha^-$ (Dudziak et al., 2007). Por su parte, las DCs $CD8\alpha^-$ son células especializadas en la presentación vía MHC-II. Cuando se dirigió la lisozima, utilizando un AcMo anti-DEC-205 humano, a las subpoblaciones de DCs $CD8\alpha^+$ y $CD8\alpha^-$ procedentes de ratones transgénicos que expresaban este receptor, sólo las DCs $CD8\alpha^-$ hDEC-205⁺ expresaron niveles altos de moléculas MHC-II que portaban péptidos derivados de la lisozima en su superficie y llevaron a cabo la presentación de estos péptidos de manera eficiente a las células T $CD4^+$ *in vitro* (Dudziak et al., 2007). También es importante el grado de maduración de las células diana. Por ejemplo, en el caso del DEC-205, que se expresa mayoritariamente en DCs inmaduras, fue necesario co-administrarlo con el AcMo anti-CD40 para inducir la maduración de las APCs ya que, en caso contrario, al dirigir el Ag a este receptor se induce tolerancia frente al mismo (Bonifaz et al., 2002; Hawiger et al., 2001). Así, el hecho de que algunos receptores, como los tipo *Toll*, sean capaces de transmitir a las APCs señales de activación, de maduración o de expresión de moléculas co-estimuladoras hace de ellos dianas especialmente interesantes ya que, al dirigir Ag a estos receptores se podría mejorar su captura e inducir la maduración de dichas células (Jackson et al., 2004; Prajeeth et al., 2010; Zhu et al., 2004).

Otro aspecto importante relacionado con el tipo de APCs en la que se expresa el receptor de interés es su localización en los órganos linfoides

secundarios. La expresión en células localizadas en los lugares de entrada del Ag en los ganglios linfáticos y en el bazo, favorece la captura del mismo por dichas células (Corbett et al., 2005; Taylor et al., 2004).

2.3.1.2 Endocitosis del Ag y presentación antigénica a los linfocitos.

Otra de las características deseables que deben de tener los receptores diana a los que se pretende dirigir el Ag es que sean endocíticos y que la internalización del Ag mediada por ellos lleve a su procesamiento y presentación unido a las moléculas de MHC. Los mecanismos de endocitosis pueden determinar la vía de procesamiento y presentación antigénica bien a células T CD4⁺ o CD8⁺. La captación de los Ags solubles mediante pinocitosis lleva a una presentación restringida a moléculas MHC-II. Sin embargo, cuando estos Ags se dirigen a determinados receptores, la presentación del mismo asociado a moléculas MHC-I y/o MHC-II viene determinada por la naturaleza del receptor (Burgdorf and Kurts, 2008). Así, cuando el receptor de manosa mediaba la endocitosis de la ovalbúmina soluble, ésta siempre era presentada a células T CD8⁺, no detectándose la activación de estas células cuando las DCs y los macrófagos procedían de ratones que carecían de este receptor (Burgdorf et al., 2007). Esta presentación exclusiva de los Ags endocitados por el receptor de manosa vía moléculas de MHC-I parece ser debida a que éstos siguen una ruta de endocitosis hacia endosomas tempranos medianamente ácidos, previniéndose la degradación antigénica y favoreciéndose su liberación posterior al citoplasma, donde tendría acceso al proteasoma y a su presentación vía moléculas MHC-I (Burgdorf et al., 2007). Por su parte, el receptor DEC-205, se internaliza a través de los endosomas tardíos que se fusionan con los lisosomas, dando lugar a la presentación de los Ags asociados a moléculas de MHC-II (Mahnke et al., 2000). Además, las diferentes vías de internalización no sólo pueden influir en el tipo de respuesta que se genera sino también en su eficacia ya que se ha descrito que dirigir el Ag al receptor DEC-205 *in vitro* es 100 veces más eficaz que al receptor de manosa, aún tratándose de receptores homólogos (Mahnke et al., 2000). Hay que tener en cuenta que las señales transmitidas a la APC a través de la interacción del complejo AcMo-Ag con el receptor, pueden

regular la eficiencia de los procesos endocíticos y la vía de procesamiento y presentación antigénicos. Así, por ejemplo, se ha descrito que la señalización en las DCs a través de algunos receptores tipo *Toll* incrementa la captación de Ags solubles y de inmunocomplejos (Watts et al., 2010). También se ha descrito que las pDCs de ratón captan la ovalbúmina soluble de manera eficiente pero sólo son capaces de presentar péptidos derivados de dicha proteína unidos a moléculas MHC-I a las células T CD8⁺ cuando reciben señales a través de los receptores TLR7 o TLR9 (Mouries et al., 2008).

2.3.2 Vectores para dirigir el Ag.

Como se ha comentado anteriormente, el Ag puede ser dirigido al receptor expresado en la superficie de las APCs, además de utilizando sus ligandos, a través de anticuerpos o de fragmentos de anticuerpos específicos. El empleo de AcMos para dirigir el Ag puede ser más restrictivo que el uso de ligandos, ya que estos pueden reconocer más de un receptor (Bartoli et al., 2001; Sanders et al., 2000). Sin embargo, la utilización de AcMos como vectores para dirigir el Ag presenta algunas desventajas ya que su tamaño molecular ralentiza su aclaramiento sanguíneo (Yokota et al., 1992), son vectores muy inmunogénicos debido en gran parte a su región Fc, su unión al Ag resulta técnicamente complicada y no pueden ser utilizados como vectores en vacunas basadas en el empleo de ácidos nucleicos. Además, existe la posibilidad de que los AcMos se unan por su región Fc a receptores específicos para estos fragmentos, eliminando de esta manera la especificidad de unión del AcMo al receptor. La endocitosis del AcMo y del Ag de interés a través de dichos receptores Fc podría modular la respuesta al ser capturado por poblaciones celulares no deseadas.

Por todo ello se han desarrollado, a través de técnicas de biología molecular o métodos químicos, fragmentos de AcMos que, manteniendo la especificidad de unión a su receptor, no presentan las desventajas anteriormente citadas. Así, se ha descrito la utilización como vectores de fragmentos Fab, formados por los dominios V_H, C_H1, V_L y C_L así como también de moléculas recombinantes que sólo presentan los dominios V_H y V_L (Fv), tales como los dsFv (fragmentos Fv estabilizados por puentes

disulfuro), los scFv (fragmentos Fv unidos mediante un péptido de unión) o los sc-dsFv (fragmentos Fv unidos mediante puentes disulfuro y un péptido de unión) (Bird et al., 1988; Glockshuber et al., 1990; Huston et al., 1988; Skerra and Pluckthun, 1988; Young et al., 1995) (Ver figura 4). De todas estas moléculas, los fragmentos scFv han sido evaluados en numerosos trabajos como vectores con los que dirigir el Ag a receptores expresados en la superficie de las APCs. Así, en ratones inmunizados con un scFv anti-DEC-205-estreptavidina unido a Ags biotinilados y con un AcMo anti-CD40, tanto la cantidad de anticuerpos específicos frente a los Ags como el número de esplenocitos productores de IFN- γ fueron superiores que en los animales que sólo recibieron los Ags biotinados y el scFv anti-DEC-205-estreptavidina o la señal estimuladora (Wang et al., 2009). También se ha estudiado la acción antitumoral de un scFv anti-CD11c, un receptor expresado principalmente en las DCs de ratón, unido al dominio extracelular del receptor tirosina-quinasa humano HER2 encontrado en varios tumores malignos humanos, en presencia de CpGs. Cuando a los ratones inmunizados con el scFv anti-CD11c-HER2_{CpG} se les transfirieron células tumorales HER2⁺ se produjo el rechazo del tumor. En estos animales se indujo una alta producción de anticuerpos específicos y una fuerte respuesta celular, detectándose una gran linfoproliferación y producción de IFN- γ en las células T CD4⁺ aisladas de estos animales en presencia de HER2. En los animales inmunizados con el scFv control-HER2_{CpG} o con HER2_{CpG}, no se obtuvo protección frente al tumor ni se detectó respuesta celular específica, sólo una baja respuesta humoral (Wei et al., 2009). Además, se han empleado scFv para dirigir *in vitro* el fragmento C de la toxina tetánica a los receptores CD14 y TLR2 en células humanas. Estas construcciones scFv fueron entre 100 y 10.000 veces más eficientes en la estimulación de clones de células T que el Ag no fusionado a dichos scFv (Tunheim et al., 2007).

Sin embargo estas construcciones, al ser monoméricas, pueden presentar menor afinidad que los AcMos de los que proceden. Además algunos receptores requieren entrecruzamiento para llevar a cabo la endocitosis del complejo molecular vector-Ag (Booth et al., 2002). Por ello, disminuyendo el tamaño del péptido de unión o utilizando dominios de dimerización, se han diseñado moléculas recombinantes basadas en la combinación de dos o más scFv con la misma o distinta especificidad

(Todorovska et al., 2001) (Ver figura 4). Se ha observado que estas moléculas multivalentes presentan alta avidéz y se ha evaluado su validez como vectores en estudios pre-clínicos (Goel et al., 2001; Nielsen et al., 2000; Yazaki et al., 2001).

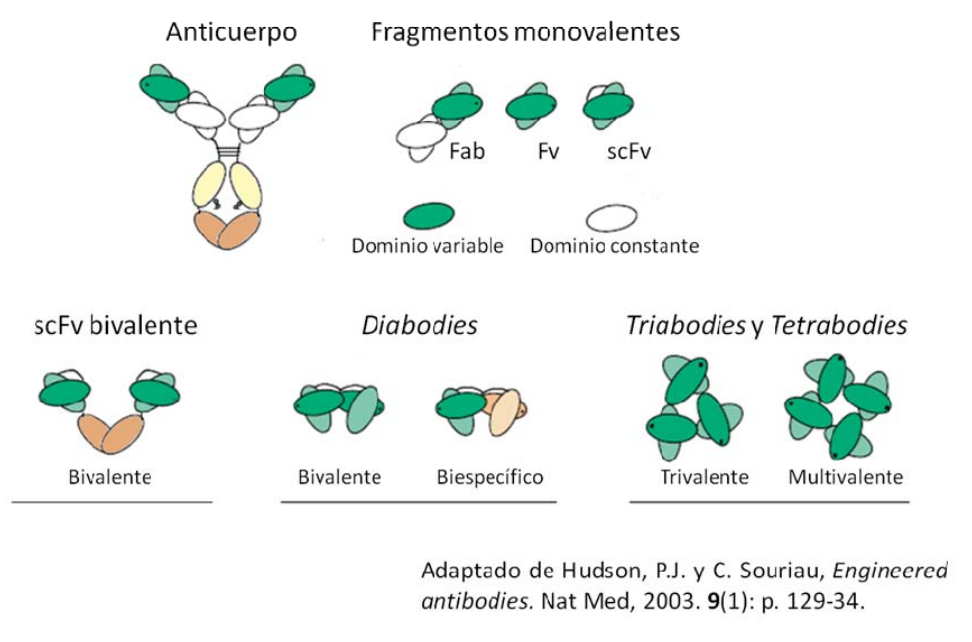


Figura 4. Representación esquemática de una Ig intacta, de los dominios variables (óvalo verde) y constantes (óvalo blanco, amarillo y marrón) de la misma, y de los fragmentos Fab y Fv. Las moléculas recombinantes que se muestran son los monómeros scFv, los dímeros formados por dos scFv unidos por la región C_H3 de la Ig y los *diabodies*, tanto monoespecíficos como biespecíficos, y los *triabodies* y los *tetrabodies*, formados por 3 y 4 scFv respectivamente. El péptido de unión del scFv está representado con una línea negra.

Otra de las ventajas del empleo de scFv es que se pueden asociar a diferentes Ags de manera sencilla mediante técnicas de Biología molecular habituales. Además se pueden inocular en forma de proteína o como vacuna de DNA y asociarlas a diferentes nanopartículas favoreciendo la captura de las mismas por las APCs.

2.3.3 Receptores seleccionados.

Debido al reducido número de trabajos que describen en especies de interés ganadero el empleo de esta estrategia para mejorar la inmunogenicidad de vacunas, en esta tesis hemos evaluado el potencial de la Sn, el CD163 y el TLR2, tres receptores expresados en la superficie de las APCs, como dianas a las que dirigir Ag en el cerdo.

2.3.3.1 Sialoadhesina.

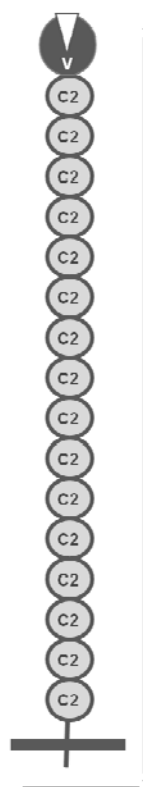


Figura 5. Representación esquemática de la estructura del receptor Sialoadhesina.

La Sialoadhesina (Sn, CD169 o *Siglec-1*) es una proteína de membrana de la familia de las lectinas con dominios de inmunoglobulinas, que reconoce ácidos siálicos (Siglecs, del inglés *sialic binding immunoglobulin-like lectins*). Esta molécula es un receptor endocítico (Van Gorp et al., 2008) que cuenta con una región extracelular con 17 dominios tipo inmunoglobulina, con el dominio de unión a ácidos siálicos localizado en la zona más distal (Ver figura 5) (Munday et al., 1999). Estudios iniciales sugerían un papel para esta molécula en los procesos de mielopoyesis. Datos más recientes apuntan a una función de la misma en la regulación de los procesos inflamatorios y de la respuesta inmune (Crocker et al., 1990; Jiang et al., 2006a; Kirchberger et al., 2005; Munday et al., 1999; Oetke et al., 2006; Wu et al., 2009). La Sn puede interaccionar con los

ácidos siálicos presentes en la superficie de diferentes patógenos, incrementando la unión de éstos a las células diana y contribuyendo a su endocitosis y fagocitosis (Carlin et al., 2007; Delputte et al., 2007; Jones et al., 2003; Monteiro et al., 2005). De hecho la Sn juega un papel relevante en la unión del virus del Síndrome respiratorio y reproductivo porcino (SRRP) a los macrófagos alveolares (Delputte and Nauwynck, 2004; Delputte et al., 2007; Vanderheijden et al., 2003).

En el hombre, el ratón y la rata, la Sn se expresa en algunas subpoblaciones de macrófagos tisulares (Crocker and Gordon, 1989; Crocker et al., 1988; Damoiseaux et al., 1991; Dijkstra et al., 1985; Hartnell et al., 2001; van den Berg et al., 1996). En el bazo, los macrófagos Sn⁺ aparecen localizados en la zona marginal, cerca de la pulpa blanca (Crocker and Gordon, 1989; Kraal and Janse, 1986) y en los ganglios linfáticos en los senos subcapsular y medular (Muerkoster et al., 1999; Umansky et al., 1996). También existen DCs que expresan este receptor localizadas en la zona perifolicular y en el interior de los folículos (Berney et al., 1999). Esta localización de las células Sn⁺ es apropiada para captar el Ag desde la sangre y la linfa. En el ratón, las células Sn⁺ en los ganglios linfáticos, en el bazo y en el hígado son capaces de captar Ag y presentar péptidos derivados de él a las células T (Berney et al., 1999; Muerkoster et al., 1999; Umansky et al., 1996). Además, como se ha descrito previamente en esta introducción, las células Sn⁺ de los órganos linfoides secundarios tienen un papel relevante en la iniciación de la respuesta inmune (Barral et al., 2010; Carrasco and Batista, 2007; Junt et al., 2007; Phan et al., 2007; Umansky et al., 1996).

Los monocitos no expresan esta molécula aunque su expresión puede ser inducida *in vivo* durante los procesos inflamatorios (Hartnell et al., 2001; Pulliam et al., 2004) e, *in vitro*, mediante el cultivo de dichas células con diferentes citoquinas, observándose algunas diferencias entre especies en su regulación (Crocker et al., 1988; Delputte et al., 2007; Hartnell et al., 2001; McWilliam et al., 1992; van den Berg et al., 1996). Además, se ha descrito que las MoDCs humanos expresan este receptor (Kirchberger et al., 2005).

2.3.3.2 CD163.

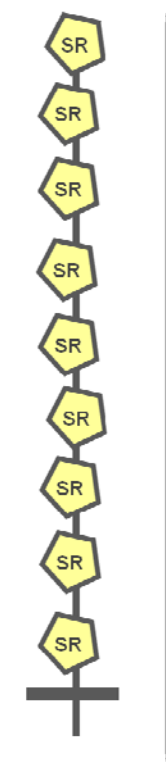


Figura 6. Representación esquemática de la estructura del receptor CD163.

El CD163 es una glicoproteína de la familia de receptores con dominios *scavenger* ricos en cisteínas (SRCR, del inglés *Scavenger receptor cysteine-rich*) (Law et al, 1993). Su porción extracelular contiene 9 dominios SRCR seguidos de una secuencia de 23 aminoácidos que constituyen la región transmembrana y por una cola intracitoplásmica de 49 aminoácidos (Law et al., 1993; Pérez et al., 2008) (Ver figura 6). Es un receptor endocítico (Bover et al., 2007; Kristiansen et al., 2001; Moreno et al., 2009; Sanchez-Torres et al., 2003) cuya función mejor caracterizada es esencialmente homeostática y está relacionada con la unión y endocitosis de complejos hemoglobina:haptoglobina (Hp-Hb) (Kristiansen et al., 2001). Sin embargo, la

regulación de su expresión por mediadores pro y antiinflamatorios (Kristiansen et al., 2001; Moestrup and Moller, 2004; Pérez et al., 2008) sugiere también un papel de este receptor en el control de los procesos inflamatorios. Además del complejo Hp-Hb, se han descrito otros ligandos para esta molécula, lo que le confiere características de receptor multifuncional involucrado en procesos de endocitosis y vías de señalización (Van Gorp et al., 2010). En células humanas, el CD163 interacciona con bacterias actuando como un sensor en los procesos infecciosos (Fabriek et al., 2009). En el cerdo está implicado en la infección de los macrófagos por el virus de la Peste porcina africana (Sanchez-Torres et al., 2003) y en la internalización del virus del Síndrome respiratorio y reproductivo porcino (Calvert et al., 2007; Van Breedam et al., 2010)

El CD163 está presente en la mayoría de los macrófagos tisulares maduros, en monocitos y en fibrocitos sanguíneos (Buechler et al., 2000; Chamorro et al., 2000; Chesney et al., 1997; Gronlund et al., 2000;

Maniecki et al., 2006; Sanchez et al., 1999; Sulahian et al., 2000; Van den Heuvel et al., 1999). En los órganos linfoides, este receptor se expresa en los macrófagos de la pulpa roja del bazo, en los de los senos subcapsular y medular de los ganglios linfáticos y en los medulares y corticales del timo. También está presente en las células de Kupffer del hígado, en los macrófagos alveolares, los localizados en la lámina propia del intestino así como en los perivascuales y meningiales del sistema nervioso central (Bullido et al., 1997b; Van den Heuvel et al., 1999).

En el cerdo se han caracterizado varias subpoblaciones de monocitos en función de la expresión de los receptores CD163, SLA II y CD14. Los monocitos CD163⁺ expresan niveles más altos de moléculas SLA-II, moléculas co-estimuladores y de adhesión y mostraban una alta capacidad como APCs (Chamorro et al., 2000). Además, estos monocitos se diferencian *in vitro*, tras cultivo con IL-4 y GM-CSF, a MoDCs con un alto potencial como APCs (Chamorro et al., 2004).

Durante algún tiempo se pensó que este marcador era exclusivo de los macrófagos y de los monocitos; sin embargo, se ha detectado su expresión en dos subpoblaciones de DCs de sangre humana (Maniecki et al., 2006). También se han descrito en la especie porcina varias subpoblaciones de DCs dérmicas CD163⁺ que muestran características similares a las DCs y a los macrófagos que existen en la piel humana y que participan en la inducción de la respuesta mediada por anticuerpos (Klechevsky et al., 2008; Marquet et al., 2011). Además, estudios recientes han demostrado que el cultivo *in vitro* de los precursores de la médula ósea de las DCs con el ligando Flt3 porcino, genera DCs CD163⁺ (Guzylack-Piriou et al., 2010).

2.3.3.3 TLR2.

El TLR2 es un miembro de la familia de receptores de reconocimiento de patrón tipo *Toll* (TLR, del inglés, *Toll like receptors*) que consta de un dominio extracelular con secuencias ricas en leucina (LRR, del inglés *Leucine Rich Repeat*), un dominio transmembrana, y un cola citoplasmática formada por un dominio TIR (del inglés Toll/interleukin-1 receptor) de unión de proteínas que interviene en la transmisión de señales (Rock et al., 1998). Los TLRs desempeñan una función muy importante en la conexión

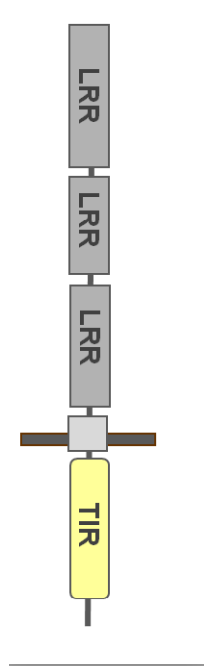


Figura 7. Representación esquemática de la estructura del receptor TLR2.

entre la respuesta inmune innata y adaptativa a través del reconocimiento de estructuras moleculares conservadas denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que aparecen en gran parte de los microorganismos. El TLR2 es un receptor endocítico (Jackson et al., 2004; Khan et al., 2007; Schjetne et al., 2003) que se presenta en las células formando los heterodímeros TLR1/TLR2 y TLR6/TLR2, que reconocen lipoproteínas bacterianas triaciladas o diaciladas respectivamente. La interacción de TLR2 con estos ligandos induce la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Medzhitov et al., 1997) y, en el caso de las DCs, su maduración (Hertz et al., 2001; Michelsen et al., 2001). Además,

es capaz de unirse a diferentes tipos de virus (Kawai and Akira, 2006) generando una respuesta inmune anti-viral caracterizada por la producción de IFN- α (Barbalat et al., 2009) lo que indica que este receptor discrimina entre diferentes clases de patógenos.

En el cerdo, al igual que en otras especies, la expresión de TLR2 se asocia a zonas de entrada de patógenos, en consonancia con su papel en la detección temprana de los mismos (Alvarez et al., 2008; Diamond et al., 2000; Droemann et al., 2003; Hertz et al., 2003; Wolfs et al., 2002). Así, en el cerdo, se ha detectado en las células epiteliales que bordean los tractos traqueobronquial e intestinal, los conductos biliares del hígado, en los túbulos renales y en la capa basal de la epidermis (Alvarez et al., 2008). En el mismo estudio se detectó la expresión de TLR2 en los monocitos, en las MoDCs, en los macrófagos y en los granulocitos, siendo negativas las células T y B sanguíneas (Alvarez et al., 2008). Sin embargo, otros autores han descrito la presencia de linfocitos T TLR2⁺ en las áreas interfoliculares de las placas de Peyer y en los ganglios linfáticos, donde también se detectaron algunas células B en los folículos con cierta expresión de este

receptor y gran cantidad de macrófagos y DCs en los cordones medulares que eran TLR2⁺ (Tohno et al., 2005). Las discrepancias entre estos dos estudios podrían deberse a los diferentes anticuerpos empleados en cada caso, un AcMo en el primero y uno policlonal en el segundo. La distribución de esta molécula en humanos refleja un patrón de expresión intermedio entre los dos trabajos realizados en la especie porcina, detectándose la expresión de TLR2 en los macrófagos y las DCs pero no en los linfocitos B y T (Ochoa et al., 2003). En el mismo estudio se observó la expresión de este receptor en los cordones medulares de los ganglios linfáticos, en la zona marginal y en los cordones de la pulpa roja del bazo así como en la médula de las amígdalas (Ochoa et al., 2003).

3. VACUNAS DE DNA.

El estudio de la vacunación genética comenzó a principios de los años 90 cuando se observó que la inyección de secuencias de DNA desencadenaba una respuesta inmune frente a la proteína codificada en la secuencia de DNA (Tang et al., 1992; Wolff et al., 1990). Esta estrategia presenta importantes ventajas con respecto al uso de vacunas vivas o atenuadas ya que las vacunas de DNA son más seguras, ofrecen la posibilidad de vacunar frente a diferentes Ags en una sola inoculación, no tienen un coste elevado y no es necesario mantener la cadena de frío para su conservación. Sin embargo, la eficacia de este tipo de vacunación varía mucho según el modelo utilizado y la estrategia desarrollada.

Las vacunas de DNA están basadas en el uso de plásmidos, los cuales han de incluir un gen que codifique el Ag diana bajo el control transcripcional de un promotor viral o eucariota, siendo uno de los más utilizados el que procede del citomegalovirus, y una secuencia señal de poliadenilación (*poly-A*) para proporcionar estabilidad y aumentar la eficacia del proceso de traducción. El plásmido además suele contener un origen de replicación bacteriano y un gen de resistencia a un antibiótico para facilitar su selección y producción en bacterias (revisado en Gurunathan et al., 2000).



Figura 7. Representación de los elementos que suelen aparecer en los plásmidos comúnmente empleados en vacunas de DNA. La unidad de transcripción incluye al promotor, a la secuencia del inmunógeno deseado y a la señal de poliadenilación. El origen de replicación bacteriano (ori) y el gen de resistencia a antibióticos son también incorporados al vector para permitir el crecimiento y selección del plásmido en bacterias.

Tras su inoculación intramuscular (i.m.), el plásmido es capaz de transfectar las APCs, los miocitos u otras células somáticas (Faurez et al., 2010). El músculo consta de tres niveles de organización, y en todos ellos se han localizado macrófagos y DCs. Varios estudios han demostrado la importancia de la transfección directa de las APCs (Condon et al., 1996; Porgador et al., 1998) aunque se ha descrito que el tipo celular que se transfecta predominantemente siguiendo este tipo de inmunización son los miocitos (Danko et al., 1997). Una vez en el interior de dichas células, los componentes del plásmido iniciarían la transcripción y producción de proteínas en el citoplasma, y la célula proporcionaría al Ag las modificaciones post-traduccionales necesarias para mantener su estructura terciaria (Dhama et al., 2008). Se ha descrito que los miocitos transfectados pueden generar respuestas citotóxicas a través de la presentación del Ag unido a moléculas MHC-I (Ulmer et al., 1996). Sin embargo, el hecho de que estas células no expresen moléculas co-estimuladoras hace poco probable que este tipo de presentación antigénica tenga lugar. Además, los miocitos podrían secretar el Ag sin procesar, pudiendo ser captado por las células B, iniciándose la respuesta humoral, y por APCs como macrófagos o DCs (Fu et al., 1997), que

lo procesarían y presentarían unido a moléculas MHC I, iniciándose una respuesta T citotóxica, o a moléculas MHC II, estimulándose las células T cooperadoras, que a su vez podrían secretar citoquinas que potenciarían la respuesta T y B. Otra vía por la que las APCs podrían captar el Ag es a través de cuerpos apoptóticos o necróticos de las células que han sido transfectadas con el plásmido (revisado en Kutzler and Weiner, 2008). El modelo hipotético de la generación de la respuesta inmune mediante la inmunización con DNA se muestra en la figura 8.

Otra de las rutas de inmunización que induce una buena respuesta tanto humoral como celular con esta clase de vacunas es la ruta intradérmica (Kunzi et al., 2009; Sugimura et al., 2008; van Rooij et al., 1998). Hay que destacar que recientemente, al igual que en humano y en ratón (Henri et al., 2010; Klechevsky et al., 2008; Ochoa et al., 2008), se ha descrito en la especie porcina la presencia de varias poblaciones de DCs localizadas en la dermis (Marquet et al., 2011), por lo que resultaría interesante evaluar la efectividad de dicha ruta de inmunización en esta especie.

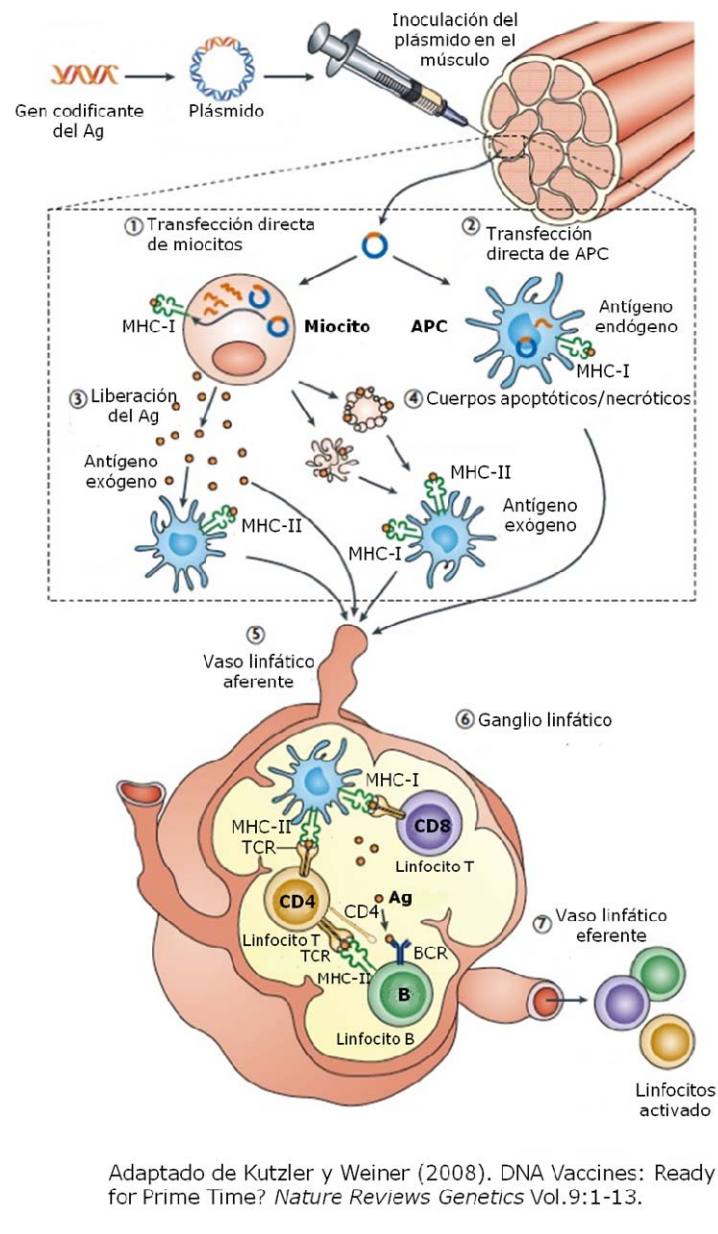


Figura 8. Modelo hipotético de la generación de la respuesta celular y humoral Ag-específica por una vacuna DNA. El plásmido inoculado en el músculo transfectaría miocitos (1) o APCs (2). El Ag podría ser también captado por las APCs una vez liberado por los miocitos (3) o a partir de células transfectadas apoptóticas o necróticas (4). Tras captar el Ag, las APCs migrarían hacia los ganglios linfáticos a través del vaso linfático aferente (5), donde presentarían el péptido a los linfocitos T activándolos. Además, las células T secretarían citoquinas y cooperarían en la activación de las células B que hubieran captado el Ag sin procesar (6). Los linfocitos T y B activados abandonarían el ganglio a través de los vasos linfáticos eferentes (7).

Uno de los principales aspectos a tener en cuenta a la hora de hablar sobre el futuro de las vacunas de DNA es la baja inmunogenicidad de las mismas que se ha observado en grandes animales y en humanos. Esto hace que este tipo de vacunas generen respuestas inmunes más débiles que otras que emplean vectores virales o proteínas recombinantes (revisado en Kutzler and Weiner, 2008). Además, la respuesta inmune que se genera utilizando vacunas de DNA no puede preverse debido a que no se conoce cuál será la concentración de proteína expresada *in vivo* y a que los niveles de transfección suelen ser bajos (Davis et al., 1993). Por ello se están evaluando diferentes estrategias que persiguen mejorar la efectividad de estas vacunas. Entre ellas se incluyen la optimización del plásmido para incrementar la expresión génica a través del empleo de promotores más potentes (revisado en Donnelly et al., 1997) o de la incorporación de elementos reguladores o potenciadores de la transcripción (Barouch et al., 2005; Kwissa et al., 2000). Además, también se puede optimizar la secuencia génica que codifica el Ag de interés mediante de la inclusión de secuencias Kozak (Kozak, 1997), de secuencias que aumenten la estabilidad del RNA mensajero (Li et al., 2000; Malin et al., 2000) o de secuencias que favorezcan la captación y/o la presentación del Ag (Nchinda et al., 2008). Finalmente otras estrategias tales como, la co-administración de citoquinas, quimioquinas o moléculas con actividad inmunomoduladora (Barouch et al., 2000) o el empleo de diferentes métodos de inoculación (Chen et al., 2002; Hirao et al., 2008) también pueden incrementar la respuesta inmune inducida por estas vacunas.

A pesar de estas dificultades, en el cerdo, se ha inducido protección frente al virus de la Peste porcina clásica inmunizando a cerdos con un plásmido que expresaba la proteína E2 en dos estudios diferentes (Andrew et al., 2000; Ganges et al., 2005). Frente al virus de la Fiebre aftosa se consiguió protección parcial inoculando a los animales con un plásmido que codificaba toda la secuencia del virus con una mutación que impedía la replicación del mismo (Beard et al., 1999), con uno que contenía los genes VP1 de los serotipos O y Asia1 y el gen 3C del serotipo O (Benvenisti et al., 2001) y con un plásmido que contenía las secuencias del precursor de la proteína estructural P1-2A y de las proteínas no estructurales 3C y 3D (Cedillo-Barron et al., 2001). Además, en 2005 fue autorizada para su uso en animales una vacuna de DNA frente a la infección por el virus *West Nile* en caballos

(Davidson et al., 2005) y otra frente al virus de la Necrosis hematopoyética en salmón (Garver et al., 2005)

4. VIRUS DEL SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO (SRRP).

Como Ag modelo para estudiar la eficacia de los scFv generados en esta tesis hemos escogido la Proteína N de la nucleocápside del virus del Síndrome respiratorio y reproductivo porcino (SRRP). El virus del SRRP pertenece a la familia *Arteriviridae* y su genoma consta de una única cadena RNA de polaridad positiva no segmentada y poliadenilada, con un tamaño aproximado de 15 Kb y compuesto por 9 marcos abiertos de lectura (ORF, del inglés *open-reading frames*) denominados ORF 1a, 1b, 2a, 2b y 3-7. Los ORFs 1a y 1b, situados al final del genoma, codifican proteínas que participan en la transcripción y replicación del DNA, mientras que el resto de la secuencia génica codifica proteínas estructurales (Meulenbergh et al., 1993). Las 3 principales proteínas que aparecen en el virión, codificadas por los ORFs 5, 6 y 7 respectivamente, son la glicoproteína de la envuelta, denominada GP₅ (25 kDa), que aparece unida por puentes disulfuro a la proteína de membrana M (18-19 kDa) y la nucleoproteína de la cápsida o proteína N (15 kDa). Asociadas a la membrana también aparecen tres glicoproteínas menores, GP2a, GP3 y GP4, codificadas por los ORF 2a, 3 y 4, respectivamente, y una pequeña proteína no glicosilada denominada 2b (Ver figura 9) (Meulenbergh et al., 1995a, b).

La principal célula diana de este virus es el macrófago, especialmente los macrófagos pulmonares y los localizados en los órganos linfoides (Rossow et al., 1995; Rossow et al., 1996; Zimmerman et al., 2006). Hay que señalar que Sn participa en la unión del virus a los macrófagos y CD163 está implicado en la infección por el mismo (Calvert et al., 2007; Vanderheijden et al., 2003). Esta enfermedad está caracterizada por provocar en los animales jóvenes un cuadro básicamente respiratorio acompañado de anorexia y fiebre (Keffaber, 1989; Loula, 1991). Además la transmisión transplacentaria da lugar a la enfermedad reproductiva caracterizada por el fallo reproductivo y el nacimiento de lechones débiles o muertos, infectados o no (Christianson et al, 1991).

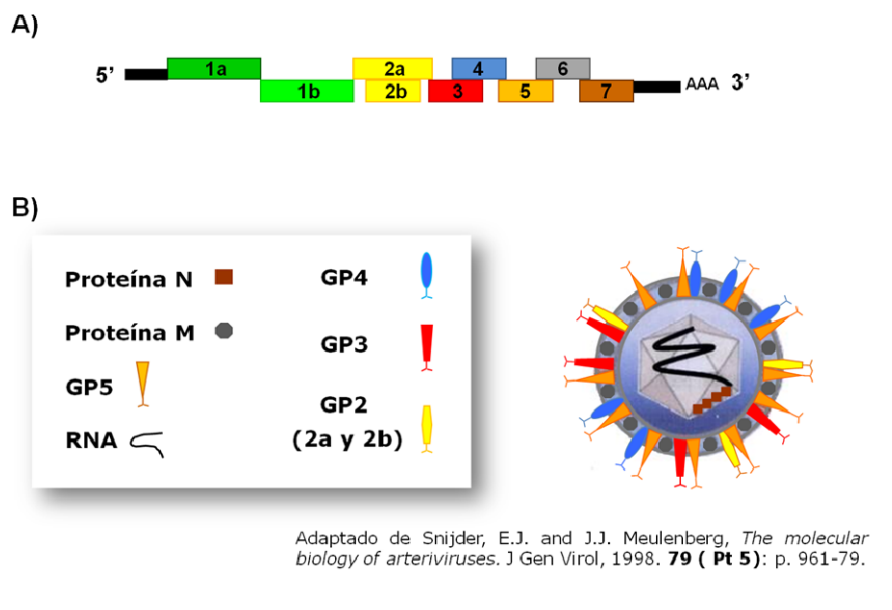


Figura 9. A. Estructura del genoma del virus del SRRP. Los ORFs están flanqueados por dos secuencias no codificantes y en el extremo 3' aparece una cola adenilada. **B.** Representación esquemática de la estructura de una partícula del virus del SRRP y situación de las proteínas estructurales.

Debido a las enormes pérdidas económicas anuales causadas por el virus del SRRP (Neumann et al., 2005) se han comercializado diferentes vacunas basadas en el empleo del virus atenuado o inactivado. Sin embargo, a pesar de ser un objetivo prioritario para el control de la enfermedad, todavía no se dispone de una vacuna eficaz frente SRRP. Las vacunas atenuadas que se están empleando, aunque pueden inducir una inmunidad protectora, al menos frente cepas homólogas, presentan importantes problemas de seguridad. El virus vacunal replica en los animales vacunados y puede persistir durante semanas en los mismos (Diaz et al., 2006; Mengeling et al., 1999; Scotti et al., 2006) pudiendo transmitirse tanto a animales susceptibles no vacunados (Botner et al., 1997; Scotti et al., 2006) como a la progenie por vía vertical. Además, siempre existe un riesgo potencial de reversión a virulencia (Storgaard et al., 1999). Por otro lado, las vacunas inactivadas para el virus del SRRP, aunque más seguras, ofrecen dudas en cuanto a su eficacia (Meng, 2000; Nilubol et al., 2004; Prieto et al., 1997; Scotti et al., 2006; Zuckermann et

al., 2007). A todo esto hay que añadir la variabilidad antigénica que dificulta la obtención de una vacuna universal y otros mecanismos que tienen como efecto que el virus pueda evadir la respuesta inmunitaria, como pueden ser la inhibición de la producción de IFN- γ (Royae et al., 2004); o la estimulación de la secreción de IL-10 (Diaz et al., 2006; Suradhat and Thanawongnuwech, 2003).

El estudio de la respuesta humoral frente al virus del SRRP ha mostrado que una gran parte de los anticuerpos neutralizantes van dirigidos frente GP5 (Nelson et al., 1994; Pirzadeh and Dea, 1997, 1998), aunque también se han detectado epítomos neutralizantes en GP4, en la proteína M y más recientemente en GP3 (Cancel-Tirado et al., 2004; Gonin et al., 1999; Meulenberg et al., 1997; Weiland et al., 1999; Yang et al., 2000). Por otra parte, se ha determinado que tanto las proteínas M (de la matriz) y N (nucleoproteína), como la glicoproteína GP5 están implicadas en la inducción de la respuesta celular (Bautista and Molitor, 1997; Bautista et al., 1999; Diaz et al., 2009; Rompató et al., 2006).

Debido principalmente a la relevancia de la GP5 en la inducción de anticuerpos neutralizantes frente al virus del SRRP, muchas de las vacunas de nueva generación que se han probado en los últimos años se han basado en el uso de esta proteína. En este sentido, algunos autores han descrito la producción de anticuerpos neutralizantes y la inducción de una protección parcial frente al desafío con una cepa homóloga, tras la inmunización de cerdos con una vacuna DNA que codificaba solo la GP5 (Pirzadeh and Dea, 1998). Sin embargo, en otros casos, la respuesta obtenida se caracterizaba por ser débil, lenta y variable (Barfoed et al., 2004; Jiang et al., 2006b; Kwang et al., 1999). Recientemente, Jiang et al (2006) han conseguido inducir títulos más altos de anticuerpos neutralizantes y una mejor respuesta celular tras inmunizar con una vacuna DNA que co-expresaba GP5 junto con la proteína M (Jiang et al., 2006b). Inoculando a los cerdos con un plásmido que codificaba la proteína N del virus del SRRP se consiguió inducir altos niveles de anticuerpos específicos (Barfoed et al., 2004; Kwang et al., 1999). Además, cuando se fusionó el gen que codificaba esta proteína con la secuencia del GM-SCF se obtuvieron altos niveles de anticuerpos específicos en los sueros de los animales y se detectaron células productoras de IFN- γ en los linfocitos T aislados de las CMSP de dicho

animales (Jeong et al., 2010). En otro estudio se protegió a los animales del desarrollo de lesiones en el pulmón y se disminuyó el nivel de replicación del virus inmunizando con un plásmido que codificaba la proteína N y empleando la IL-2 como adyuvante (Xue et al., 2004). También, inmunizando a animales con un plásmido que codifica esta proteína, se consiguió una reducción de la carga viral de los animales infectados (Rompato et al., 2006). Además, cuando la vacuna se co-administró con la IL-2, se produjo un aumento significativo en los niveles de linfoproliferación de las CMSP estimuladas con el virus (Rompato et al., 2006).

OBJETIVOS

La dirección de Ag a receptores expresados en la superficie de las APCs para mejorar su captura y presentación a los linfocitos, es uno de los abordajes que se están estudiando para aumentar la inmunogenicidad de las vacunas. Para ello se están empleando como vectores AcMos específicos fusionados al Ag. Entre las características a considerar en la selección de los receptores a los que dirigir el Ag se debe tener en cuenta su patrón de expresión, que ha de ser lo más restringido posible a APCs, que sean endocíticos y que su internalización, junto con el vector y el Ag, lleve al procesamiento y presentación de dicho Ag asociado a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad. En el modelo de ratón se ha conseguido mejorar la respuesta inmune dirigiendo el Ag a diversos receptores expresados en diferentes poblaciones celulares con capacidad de presentación antigénica (Bonifaz et al., 2004; Carter et al., 2006; Castro et al., 2008; Tagliani et al., 2008; Zhang et al., 2006). Sin embargo, en el momento de iniciar esta tesis no se había publicado ningún trabajo evaluando esta estrategia en la especie porcina. En esta tesis nos propusimos estudiar el papel de la Sn, el CD163 y el TLR2 como receptores a los que dirigir el Ag, ya que dichas moléculas se expresan en APCs localizadas en zonas de captura de Ag en órganos linfoides secundarios. Consideramos que es importante realizar este tipo de estudios en la especie de interés debido a las diferencias existentes entre especies en los mecanismos que participan en la inducción y regulación de la respuesta inmune (revisado en Hein and Griebel, 2003). Para comprobar la idoneidad de estos receptores, estudiamos el fenotipo de las células que los expresan en los órganos linfoides secundarios porcinos, la capacidad de los receptores seleccionados de mediar la endocitosis de los AcMos utilizados como vectores y, si dicha endocitosis llevaba al procesamiento y presentación del Ag a los linfocitos.

Los objetivos concretos que nos hemos propuesto para ello han sido:

1. Estudiar en los ganglios linfáticos y en el bazo la distribución de las células positivas para Sn, CD163 o TLR2 y la expresión en las mismas de receptores asociados a APCs.

2. Analizar la capacidad de los receptores seleccionados de endocitar los AcMos específicos frente a ellos.

3. Evaluar si la captura y endocitosis de los AcMos empleados mejora la presentación del Ag a las células T mediante ensayos de linfoproliferación Ag-específica.

4. Valorar el potencial de los AcMos frente a los receptores Sn, CD163 y TLR2 de actuar como vectores para dirigir el Ag *in vivo*. Se estudiará la respuesta inmune inducida en los animales en los que se ha dirigido el Ag a dichos receptores y se comparará con la respuesta desencadenada en los animales control.

5. Se generarán proteínas recombinantes scFv derivadas de los AcMos que mayor eficacia muestren como vectores vacunales. y se comprobará que mantienen su capacidad de unión a sus receptores específicos, que su patrón de reactividad en tejidos es el mismo que el encontrado con los AcMos de los que proceden y que son endocitadas de manera eficiente.

6. Evaluar la capacidad inmunomoduladora *in vivo* en un modelo de inmunización con DNA de los scFv generados utilizando como Ag modelo la nucleoproteína del virus del SRRP.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES.

Se emplearon cerdos *Large-White* de edades comprendidas entre 2-12 meses como donantes de sangre y tejidos.

Todos los experimentos fueron realizados siguiendo las normas del Comité de Ética del Instituto.

2. CÉLULAS Y LÍNEAS CELULARES.

2.1. Células mononucleares de sangre periférica (CMSP).

La obtención de la sangre se realizó mediante punción de la vena cava anterior, recogiénose en tubos estériles con 8mM EDTA (Merck, Alemania) como anticoagulante. La sangre anticoagulada se sedimentó durante 30 minutos con una solución de dextrano (*Dextran from Leuconostoc mesenteroides*, Sigma, EE.UU) al 6% en PBS pH 7.4. Se recogió la fase superior rica en leucocitos y se centrifugó durante 15 minutos a 250 x g a temperatura ambiente (TA).

Con el sedimento celular se realizó una separación en un gradiente de Percoll (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suecia) al 61% (Gonzalez et al., 1990), centrifugando a 300 x g durante 15 minutos a 25°C. Las CMSP localizadas en la interfase se recogieron y se lavaron 2 veces en PBS (BioWhittaker, Bélgica) con 2% SFB (BioWhittaker, Bélgica), previamente descomplementado a 57°C durante 30 minutos. A continuación se resuspendieron en medio RPMI 1640 (BioWhittaker, Bélgica) suplementado con 10% SFB descomplementado, 2mM de L-glutamina (BioWhittaker, Bélgica), 5×10^{-5} M de β -mercaptoetanol (Serva, Alemania) y 50 μ g/ml de gentamicina (BioWhittaker, USA) (medio RPMI completo). En aquellas muestras en las que se observó contaminación de eritrocitos se llevó a cabo un tratamiento hipotónico para eliminarlos.

El recuento celular se realizó en una cámara de *Neubauer*, utilizando azul Tripán (Dr. G. Grüber & Co, Alemania) como colorante vital.

2.2. Monocitos.

Para realizar el aislamiento de los monocitos, las CMSP fueron incubadas durante 30 minutos a 4°C con una mezcla de los AcMos anti-CD3, anti-CD45RA y anti-CD8 α (ver tabla 1). Posteriormente se lavaron con PBS, 5% SFB y 2mM EDTA, previamente degasificado, e incubaron durante 15 minutos a 4°C con microesferas magnéticas recubiertas con un anticuerpo

anti-Igs de ratón (Miltenyi Biotec, Alemania). La suspensión celular se lavó y pasó por una columna de separación negativa MACsCS (Miltenyi Biotec, Alemania). Se recogió la fracción eluída y se analizó su pureza por citometría de flujo empleando un AcMo anti-CD172a (ver tabla 1). La pureza de monocitos fue $\geq 90\%$.

2.3. Células dendríticas derivadas de monocitos (MoDC).

Las MoDCs fueron obtenidas cultivando los monocitos 7 días con rpGM-CSF (50 ng/ml), rpIL4 (50 ng/ml) e IFN α (0,8 U/ml) siguiendo el protocolo descrito para la obtención de MoDCs humanas y porcinas (Johansson et al., 2003; Paquette et al., 1998). Las citoquinas se adquirieron en Biosource (EE.UU.) excepto el IFN α que fue cedido generosamente F. Lefevre (INRA, Francia).

2.4. Células T.

Para su enriquecimiento en células T, la suspensión de CMSP se pasó por una columna de lana de nylon (Polysciences, EE.UU.) previamente equilibrada con medio completo a 37°C. Tras su incubación en la columna durante 2 horas a 37°C, las células T se eluyeron en el mismo medio.

2.5. Macrófagos alveolares.

Para la obtención de los macrófagos alveolares se sacrificaron los cerdos seccionando la vena yugular y realizando una sangría a muerte tras la administración intramuscular (i.m.) de 25-30 mg/kg de Ketamina y 1-3 mg/kg de Xilacina o 20 mg/kg de Zoletil 100 (Tieletamina y Zolacepan; Virbac, España). Posteriormente se realizó un lavado broncoalveolar, siguiendo el protocolo descrito por Bullido et al. (1996) que, en términos generales consiste en realizar varios lavados de los pulmones con una solución de PBS estéril (Bullido et al., 1996). Las células fueron resuspendidas en RPMI completo, se determinó su viabilidad utilizando azul tripán y se congelaron en nitrógeno líquido hasta su uso, resuspendidas en SFB con 10% de DMSO (Sigma, Reino Unido).

2.6. Células de bazo y ganglios linfáticos.

Para la obtención de los órganos se sacrificaron los cerdos administrándoles por vía intramuscular (i.m.) 25-30 mg/kg de ketamina y

1-3 mg/kg de xilacina y posteriormente los animales fueron exanguinados. Los órganos se obtuvieron de cerdos recién sacrificados y, tras su fragmentación, se mantuvieron a 4°C en tubos de 50 ml con PBS estéril.

Para la obtención de las suspensiones celulares, las piezas de los distintos órganos fueron disgregadas con el émbolo de una jeringa en una placa de *Petri* estéril 60X15 mm² (Labclinics, España) que contenía RPMI completo. Tras lisar los eritrocitos mediante choque hipotónico, las células se lavaron en el mismo medio, se contaron y se comprobó su viabilidad con azul tripán.

2.7. Líneas celulares empleadas en los ensayos de transfección.

Para analizar la expresión de las proteínas codificadas por los diferentes plásmidos, se transfectaron células CHO crecidas en medio DMEM (BioWhittaker, Bélgica) suplementado con 2mM de L-glutamina, 5% de SFB descomplementado y 50 µg/ml de gentamicina.

3. ANTICUERPOS.

Reactividad	AcMo	Isotipo	Patrón de expresión	Proveedor o referencia
Sialoadhesina (Sn, CD169, Siglec 1)	3B11/11	IgG ₁	Macrófagos, MoDCs y monocitos inflamatorios	(Bullido et al., 1997b)
	1F1	IgG _{2a}		(Revilla et al., 2009)
TLR2	1H11	IgG ₁	Monocitos/macrófagos granulocitos y células epiteliales	(Alvarez et al., 2008)
CD163	2A10	IgG ₁	Monocitos/macrófagos	(Sanchez et al., 1999)
	2H12	IgG ₁		(Pérez et al., 2008)
CD172a/SWC3	BL1H7	IgG ₁	Células mieolomonocíticas	(Alvarez et al., 2000)
	BA1C11	IgG ₁		
CD45RA	3C3/9	IgG ₁	Células linfoides	(Bullido et al., 1997c)
(Desconocido)	2B2	IgG ₁	Granulocitos	(Perez et al., 2007)
CD3	BB23-8E	IgG _{2b}	Células T	(Pescovitz et al., 1998)
CD8 α	76-2-11	IgG _{2a}	Subpoblación células T	(Pescovitz et al., 1984)
IgG ₁ porcina	K139-3C8*	IgG ₁		(Sinkora et al., 2001)
IgG ₂ porcina	K68-1G2*	IgG ₁		(no publicado)
SLAII DR	1F12	IgG _{2b}	Macrófagos, monocitos, DCs y subpoblaciones de linfocitos	(Bullido et al., 1997a)
CD11R1	MIL4*	IgG ₁	Granulocitos, DCs, células NK	(Haverson et al., 1994)
CD11R3	2F4/11		Granulocitos, monocitos y marófagos	(Bullido et al., 1996)
Vp30 del virus de la Peste porcina africana	1D9	IgG _{2a}		(no publicado)
Virus de la Necrosis pancreática infecciosa (IPN)	4B9	IgG ₁		(Dominguez et al., 1991)

*Los hibridomas productores de los AcMos K139-3C8, K68-1G2 y MIL4 fueron cedidos amablemente por el Dr. K. Haverson (Universidad de Bristol, Inglaterra).

Tabla 1. Anticuerpos producidos en nuestro laboratorio utilizados durante esta tesis.

3.1. Producción de AcMo en sobrenadantes de cultivo.

Los hibridomas productores de los diferentes AcMos se expandieron a frascos de 75 ó de 175 cm² (Labclinics España), según el volumen necesario para realizar los posteriores estudios. Estas células se cultivaron en medio RPMI 1640 con 10% de SFB descomplementado, 2mM de L-glutamina, 50 µg/ml de gentamicina. A este medio de cultivo se le añadió 2mM de piruvato sódico si el hibridoma se obtuvo a partir de células de mieloma X63/Ag 8.653, u OPI (1,1mM de oxalacetato, 0,45 mM de piruvato sódico y 0,04 U/ml de insulina bovina) si la línea de mieloma empleada fue Sp2/0-Ag 14. En aquellos casos en que los AcMos necesitaron ser purificados, se siguió el mismo protocolo de producción adaptando a los hibridomas productores a crecer en un medio libre de suero (*EX-CELL Hybridoma Medium, serum-free*, Sigma EE.UU.).

3.2. Cuantificación de anticuerpos presentes en sobrenadantes de cultivo.

Se tapizaron placas de 96 pocillos de fondo plano *polysorp* (Nunc, Dinamarca) con 10 µg/ml de un anticuerpo generado en conejo que reconoce Igs de ratón (Dako, Dinamarca) diluido en PBS y se incubaron 18 horas a 4°C. Después de 6 lavados en PBS 0,5% Tween 20 (Merk, Alemania) las placas se bloquearon durante 1 hora a 37°C con PBS 1% BSA (Sigma-Aldrich, EE.UU.). Tras 6 lavados se incubaron durante 1 hora a TA con diluciones seriadas de los sobrenadantes de los hibridomas a cuantificar, utilizando como diluyente PBS 1% BSA 0,01% Tween 20. Como curva patrón se emplearon anticuerpos purificados de concentración conocida y del mismo isotipo que el AcMo que se estaba cuantificando. Después de 6 lavados las placas se incubaron durante 1 hora a TA con un anticuerpo generado en conejo que reconoce Igs de ratón unido a peroxidasa (Dako, Dinamarca), se lavaron y se les añadió el sustrato, O-fenildiamina (OPD) (Sigma, Alemania), previamente disuelto en tampón citrato-fosfato 0,05M pH 5 y al que se le había añadido H₂O₂ al 0,001%. La reacción se frenó con el mismo volumen de H₂SO₄ 2N, cuantificándose la absorbancia a una longitud de onda de 492 nm.

3.3. Purificación de AcMo.

La purificación de las Igs se llevó a cabo por cromatografía de afinidad en una columna de proteína G-Sepharosa 4 *Fast Flow* (GE Healthcare, Suecia). La resina se rehidrató en PBS, se montó la columna y se equilibró con tampón fosfato sódico 20mM pH=7 (tampón de unión). El sobrenadante de cultivo, previamente diluido 1/2 en este mismo tampón, se aplicó sobre la columna, eliminándose las proteínas no adsorbidas mediante lavados con dicho tampón. Las Igs adsorbidas a la resina se eluyeron con una solución de glicina-HCL 0,1M pH 2,7 (tampón de elución), recogiendo fracciones de 1 ml, las cuales, una vez neutralizadas con Tris-HCl pH 9 y cuantificadas por espectrofotometría, se sometieron a diálisis frente PBS.

Para conocer la cantidad de Ig purificada se midió la absorbancia a 280 nm, calculándose la concentración de la proteína mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Absorbancia 280 nm}}{\text{Coeficiente de extinción (E}^{1\%}_{280\text{nm}})} \times 10 \text{ mg/ml}$$

El coeficiente de extinción molar estimado para las γ -globulinas es de 13,8 (Whitaker et al, 1980).

3.4. Marcaje de los AcMo.

3.4.1. Marcaje con Biotina.

Los AcMos purificados se dializaron frente a bicarbonato sódico 0.1 M pH 8,3 y se ajustó su concentración a 1 mg/ml. A cada mg de la solución de AcMo se le añadieron 125 μ g de una solución de N-hidroxi-succinimida-biotina (Sigma, EE.UU.), disuelta en DMSO. La mezcla se mantuvo en agitación durante 4 horas a TA, dializándose a continuación frente a PBS.

3.4.2. Marcaje con Alexa.

El marcaje se realizó mediante un *kit* comercial siguiendo las instrucciones del fabricante (Molecular Probes, EE.UU.). Los AcMos purificados y dializados frente a PBS se ajustaron a una concentración de 2 mg/ml. A continuación se añadieron 50 μ l de bicarbonato sódico 1 M pH 8,3 por cada mg de anticuerpo. La mezcla se transfirió a un vial que contenía el fluorocromo, incubándose en agitación durante 1 hora a TA. La reacción se detuvo añadiendo a la mezcla 15 μ l de hidroxilamina pH 8,5 y se incubó

durante 15 minutos a TA. La solución se pasó a través de una columna en la que previamente se había empaquetado la resina proporcionada en el *kit*, recogiendo la fracción coloreada que contenía el AcMo marcado libre del fluorocromo que no se había incorporado. Como tampón de elución se utilizó PBS.

Los anticuerpos conjugados se conservaron a 4°C con 0,01% de merthiolate (Sigma, EE.UU.) como antimicrobiano.

4. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE ENDOTOXINA BACTERIANA.

Se analizó la presencia de endotoxina bacteriana en los AcMos que fueron utilizados para las inmunizaciones y en los estudios de proliferación Ag-específica empleando el test comercial *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) (Cambrex, EE.UU.). Para ello, en una placa estéril de 96 pocillos (Labclinics, España) previamente atemperada a 37°C, se dispensaron cada una de las muestras a analizar, sobre las que se añadió un extracto acuoso de células sanguíneas del cangrejo de herradura *Limulus polyphemus*. Tras una incubación de 10 minutos se añadió un sustrato cromogénico, facilitado en el *kit*, y se dejó desarrollar la reacción durante 15 minutos. La presencia de endotoxina bacteriana en las muestras produce la activación de una proenzima existente en el LAL que, a su vez, es capaz de catabolizar el sustrato, generando un producto cuantificable por espectrofotometría a una longitud de onda de 405-410 nm. Este ensayo es capaz de detectar cantidades inferiores a 10 pg/ml de LPS (lipopolisacárido).

5. CITOMETRÍA DE FLUJO.

Se lavaron las células ($2,5 \times 10^5$ /pocillo) 2 veces con PBS 0,1% BSA 0,01% de azida sódica (Sigma, Alemania) (tampón de fluorescencia, TF) y se repartieron en placas de 96 pocillos de fondo en V (Costar, Inglaterra). Posteriormente se incubaron durante 30 minutos a 4°C con el sobrenadante del hibridoma. Después de dos lavados con TF, las células se incubaron durante 30 minutos a 4°C con una solución de fragmentos (Fab')₂ de un anticuerpo policlonal de conejo que reconoce Igs de ratón conjugado con FITC o PE (Dako, Dinamarca), protegiendo la placa de la luz. Tras 2 lavados, las células se fijaron con tampón fijador (0,1% de formaldehído, Sigma, Alemania).

En algunos experimentos las células fueron incubadas durante 30 minutos a 4°C con 50 µl de AcMo purificado y marcado con Alexa 488 o con biotina. En este último caso, después de dos lavados con TF, las células se incubaron con estreptavidina-PE (Sourthen Biotechnology, EE.UU.) durante 15 minutos. Tras varios lavados se resuspendieron en tampón fijador para su análisis.

Como control negativo se utilizaron AcMos irrelevantes del mismo isotipo (ver tabla 1) sin marcar, o marcados con Alexa 488 o biotina según el protocolo utilizado.

Las suspensiones celulares, marcadas con los diferentes anticuerpos, fueron adquiridas y definidas mediante un citómetro de flujo *FACSCalibur* (Becton Dickinson, EE.UU.). El número de células que se adquirieron varió entre 5000 y 10000 células.

El análisis de los datos se llevó a cabo con el programa *WinMDI* (desarrollado por Joseph Trotter y disponible en Internet desde <https://facs.scripps.edu/software.html>). Los porcentajes de células positivas se obtuvieron al representar en histogramas o en *dotplots* la intensidad de fluorescencia de las células marcadas frente al número de células.

6. INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFUORESCENCIA.

Se realizaron cortes de 6 µm de ganglios mediastínicos o bazo congelados incluidos en OCT (Tissue-teck, EE.UU.) que fueron fijados con acetona (Merk, Alemania) durante 10 minutos y posteriormente lavados con PBS.

Para los análisis inmunohistoquímicos se utilizó la técnica de la inmunoperoxidasa indirecta (Domenech et al., 2003). Los cortes de tejidos se incubaron con los sobrenadantes de cultivo de los diferentes AcMos durante 90 minutos a TA. Después de varios lavados en PBS, las preparaciones se incubaron durante 1 hora con un anticuerpo de conejo que reconoce Igs de ratón conjugado con HRP. Después de volver a lavar en PBS, se incubaron durante 5 minutos con una solución de 0,6 mg/ml de diaminobenzidina (Sigma, Alemania) y 0,02% de H₂O₂ en PBS. Finalmente se lavaron, se tiñieron los núcleos con hematoxilina (Thermoscientific, Reino Unido) y se montaron con DePex (Serva, Alemania).

En los estudios mediante inmunofluorescencia, los cortes de tejido se bloquearon durante 20 minutos con 10% de suero normal de cabra. A

continuación se incubaron con los AcMos no marcados durante 1 hora a TA. Después de varios lavados con PBS, los cortes se incubaron durante 1 hora con un anticuerpo policlonal generado en cabra que reconoce Igs de ratón, conjugado con Rodamina Red-X (Invitrogen, EE.UU.). Posteriormente, tras volver a lavar, se bloquearon durante 30 minutos con 10% de suero normal de ratón y se incubaron con los AcMos marcados con Alexa 488, 1 hora a TA. Tras nuevos lavados, los tejidos se montaron con *FluorSave Reagent* (Calbiochem, Alemania) y se analizaron empleando un microscopio confocal Leica DM IRE2 (Leica, Alemania).

7. OBTENCIÓN Y MARCAJE PARA SU ANÁLISIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO DE SUSPENSIONES CELULARES DE BAZO Y GÁNGLIOS LINFÁTICOS.

7.1. Disgregación de los órganos.

Los órganos se fragmentaron en piezas de aproximadamente 0,03 cm³ y se incubaron durante 1 hora a 37° C en una solución de HBSS (BioWhittaker, Bélgica), que contenía 1 mg/ml de colagenasa VIII (Sigma-Aldrich, EE.UU.), 0,02 mg/ml de DNasa I (Applichem, Alemania), 5 mM de Cl₂Ca y 2% de SFB descomplementado. Los fragmentos restantes se disgregaron empleando el émbolo de una jeringa y un separador celular con malla (BD Falcon, Bélgica). Las suspensiones celulares obtenidas se pasaron a un tubo y se centrifugaron a 350 X g durante 8 minutos. A continuación las células se lavaron 3 veces en PBS con 2% de SFB, se contaron en presencia de azul tripán, empleando una cámara de Neubauer y finalmente se ajustaron a 50 x 10⁶ células/ml.

7.2. Citometría.

Las células (1 x 10⁶ por pocillo) se lavaron 2 veces con PBS, BSA 0,1% y azida sódica 0,01% (TF) y se repartieron en placas de 96 pocillos de fondo en V. A continuación, se incubaron durante 20 minutos a 4°C, con 50 µl de sobrenadante puro de hibridoma de los AcMos específicos de cada uno de las moléculas cuya expresión queríamos determinar en las subpoblaciones identificadas por Sn y CD163. Después de dos lavados en TF, centrifugando las placas a 340 x g durante 3 minutos, las células se incubaron durante 20 minutos a 4°C, con una solución de fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de cabra anti-Igs de ratón conjugados con APC (Southern Biotech, EE.UU.). Tras

2 lavados, las células se incubaron con 20 μ l de suero normal de ratón, diluido al 5% en TF, durante 10 minutos a TA, con objeto de bloquear los sitios de unión residuales en el anticuerpo anti-Igs de ratón. A continuación se añadieron directamente los anticuerpos biotinilados (2A10 o IgG1 irrelevante de ratón) y conjugados con Alexa 488 (1F1 o una IgG2a irrelevante de ratón), incubándose durante 20 minutos a 4°C. Tras 2 nuevos lavados, los anticuerpos biotinilados se revelaron con estreptavidina conjugada con PercP (BD Pharmingen, EEUU). Tras 2 lavados, las células se resuspendieron en TF para su análisis. Para excluir las células muertas se añadió Ioduro de propidio (Sigma, Alemania) (1 μ g/ml) a las células en el momento de la adquisición en el citómetro de flujo. Se adquirieron entre 300.000 y 500.000 células dependiendo del experimento. El citómetro de flujo en el que adquirieron las suspensiones celulares y el programa de análisis de los datos se muestran en el apartado 5 de material y métodos.

8. VIRUS DEL SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO (SRRP).

Se utilizó la cepa 5710 del virus del SRRP aislada en el Norte de España en 1992 y cedida por el Dr. Jose M^a Castro (Facultad de Veterinaria, UCM)

8.1. Producción del virus del SRRP.

El virus se cultivó en células de la línea de riñón de mono MARC-145. Para ello se utilizaron frascos de cultivo de 75 ó 150 cm², a los que se añadió medio DMEM con 2% de SFB descomplementado, 2mM de L-glutamina, 50 μ g/ml de gentamicina, manteniéndose a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Cuando la confluencia del tapiz fue de un 80% se retiró el medio y se añadió el inóculo del virus del SRRP de tal manera que la MOI fuera de 0,1. Después de 2 horas de adsorción a TA, se añadió medio sobre el inóculo hasta completar un volumen de 15 ó 40 ml según el tamaño del frasco. Transcurridos 3-4 días de cultivo, cuando se observó el efecto citopático característico del virus en más del 80% de las células, los frascos de cultivo se congelaron (-80°C) y se descongelaron (37°C) 3 veces consecutivas. El homogeneizado celular se recogió, centrifugándose a 300 g durante 5 minutos, para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se distribuyó en tubos y se congeló a -80°C hasta su posterior utilización.

En paralelo se produjo un homogeneizado a partir de células MARC-145 no infectadas para su uso como control negativo.

8.2. Titulación del virus SRRP.

Los distintos lotes del virus se titularon en la línea celular MARC-145. Para ello se utilizaron placas de 96 pocillos estériles y se tapizó cada pocillo con 10^4 células en DMEM con 2% de SFB descomplementado, 2mM de L-glutamina, 50 µg/ml de gentamicina. Tras cultivar las células durante 24 horas a 37°C en un 5% de CO₂, se aspiró el medio y se añadieron diluciones seriadas en base 10 del inóculo viral, utilizando como diluyente el mismo medio de cultivo. Los cultivos celulares se mantuvieron en el incubador, realizándose diariamente la lectura de las placas hasta el día 7 después de la infección con objeto de valorar el efecto citopático.

El título del virus se calculó utilizando el método descrito por Reed y Muench (Reed and Muench, 1938), expresándose en forma de DI₅₀CT/ml.

9. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOS AcMo ANTI-Sn, ANTI-CD163 y ANTI-TLR2 DE DIRIGIR Ag A APCs.

9.1. Estudio de la capacidad de endocitosis de los receptores Sn, CD163 y TLR2 al unirse a ellos los AcMo 1F1, 2A10 y 1H11.

El ensayo se realizó en macrófagos alveolares que fueron incubados 30 minutos a 4°C con los AcMos 1F1, 2A10 o 1H11 marcados con Alexa488 (ver tabla 1) diluidos en TF sin azida para permitir la endocitosis. Tras varios lavados se transfirieron a 37°C durante 15, 30 ó 45 minutos. Posteriormente, para disociar el AcMo unido a moléculas de la superficie, se trataron durante 15 segundos con un tampón de pH ácido (0,5% de ácido acético y 0,5 M NaCl, pH 2,8, ambos reactivos de Merk, Alemania), detectándose de esta manera únicamente la fluorescencia intracelular resultado de la endocitosis. Como control de unión inespecífica, se empleó un AcMo irrelevante del mismo isotipo, marcado con Alexa488 (ver tabla 1).

El marcaje total de superficie se determinó incubando las células con el anticuerpo a 4°C en TF en presencia de 0,01% azida sódica. Para comprobar la capacidad de disociación del tampón de pH ácido se incubaron las células como en el caso anterior y a continuación se trataron con dicho

tampón, no obteniéndose de esta manera ningún marcaje. Las células se fijaron y analizaron por citometría de flujo.

9.2. Modulación de la expresión de la molécula de Sn en monocitos mediante citoquinas.

Para analizar la regulación de la expresión de la molécula de Sn por diferentes citoquinas, los monocitos obtenidos como se describe en el apartado 2.2. de material y métodos, fueron incubados durante 24 horas ó 48 horas en medio RPMI completo con rpIFN γ (400 U/ml) o rpIFN α (0,8 U/ml), ambos cedidos por Dr. F. Lefevre (INRA, Francia); con rpIL10 (50 ng/ml), IL4 (50 ng/ml) o rpGM-CSF (50 ng/ml), obtenidos de Biosource (EE.UU.), o con suero porcino al 20% (Harlan Sera-lab, Reino Unido).

La expresión de la Sn tras esos tratamientos se analizó mediante citometría de flujo utilizando sobrenadante de cultivo del hibridoma productor del AcMo 1F1 (ver tabla 1), siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5 de material y métodos.

9.3. Evaluación *in vitro* del efecto de dirigir Ag a los receptores Sn, CD163 y TLR2.

9.3.1. Modelo experimental.

Para evaluar la capacidad de diferentes AcMos de dirigir Ag a APCs se desarrolló un ensayo utilizando como células respondedoras CMSP de cerdos inmunizados con una mezcla de Igs de ratón de diferentes isotipos. Estas Igs son inmunogénicas en el cerdo por lo que no fue necesario fusionar dichos AcMo con el Ag, lo cual es técnicamente más complicado. Se comparó la proliferación Ag-específica inducida por diferentes AcMo que reconocían receptores expresados en la superficie de las APCs porcinas con la inducida por una Ig irrelevante del mismo isotipo en las CMSP procedentes de estos animales.

9.3.2. Inmunizaciones.

Se inmunizaron cerdos (n=4) de 4 meses de edad con una mezcla de IgGs irrelevantes de ratón purificadas (Sigma, EE.UU.). La inmunización se realizó por vía i.m. en los glúteos, inyectando a cada animal, en cada una de las 3 inmunizaciones realizadas, 1 mg de la mezcla de Igs en 1 ml de PBS estéril. Las inoculaciones se realizaron con intervalos de 3 semanas.

Para la primera inmunización se emulsionó con adyuvante completo de Freund (Sigma, EE.UU.) y para las dos posteriores con adyuvante incompleto (Sigma, EE.UU.).

9.3.3. Análisis de proliferación Ag-específica de linfocitos T.

Las CMSP procedentes de los cerdos inmunizados se estimularon con diferentes concentraciones de los AcMos 1F1, 3B11, 2A10, 2H12 ó 1H11 (ver tabla 1). Dichos AcMos presentaban cantidades de LPS inferiores a 10^{-7} µg/ml.

En el caso de los AcMo anti-CD163 y anti-TLR2 se sembraron $2,5 \times 10^5$ CMSP por pocillo en placas estériles de 96 pocillos con fondo plano (Labclinics, España).

Cuando la estimulación se realizó con los AcMos anti-Sn fue necesario inducir previamente la expresión de la molécula de Sn en las células que actúan como presentadoras, sembrándose $2,5 \times 10^5$ linfocitos T y 5×10^4 APCs por pocillo. En algunos experimentos, estas APCs fueron monocitos incubados durante 24 horas con 0,8 unidades de IFN α y en otros MoDCs obtenidas como se ha descrito anteriormente.

Como controles de referencia se utilizaron células de los animales inmunizados incubadas con AcMos irrelevantes de los mismos isotipos que los AcMos objeto de estudio (ver tabla 1) o sólo con el medio de cultivo (RPMI completo). Como control negativo se emplearon células procedentes de cerdos no inmunizados y como control positivo CMSP activadas con 0,5 µg/ml de concanavalina A (Sigma, EE.UU.)

Tras 4 días de cultivo a 37°C en una atmósfera al 5%CO₂, se les añadió 1 µCi de ³H-timidina (Perkin Elmer, EE.UU) por pocillo. La incorporación de ³H-timidina se cuantificó 18 horas después en un contador de centelleo (Perkin Elmer, Finlandia).

9.4. Estudios *in vivo* del efecto de dirigir Ag a los receptores Sn, CD163 y TLR2.

9.4.1. Modelo experimental.

Se inmunizaron cerdos con los AcMos anti-Sn, anti-CD163 o anti-TLR2 para evaluar su capacidad como vectores para dirigir Ag a las APCs *in vivo*. Como controles se emplearon animales inmunizados con AcMos irrelevantes del mismo isotipo que los AcMos específicos. En el cerdo estos AcMos, al

haber sido generados en ratón, actúan como anticuerpo e inmunógeno al mismo tiempo. Se comparó la respuesta celular y humoral inducida frente a las Igs irrelevantes de ratón en los diferentes grupos de cerdos.

9.4.2. Inmunizaciones.

Se inocularon cerdos de 2-3 meses de edad en la oreja por vía s.c. y sin adyuvante, con 1 mg de los AcMos 1F1 (n=6), 2A10 (n=5), 2H12 (n=5) ó 1H11 (n=5), reinmunizándolos de la misma manera a las 6 semanas. Como controles negativos y siguiendo el mismo protocolo se inmunizaron cerdos con los AcMos irrelevantes 4B9 (n=5) y 1D9 (n=6) (ver tabla 1), los cuales tienen el mismo isotipo que los AcMos específicos frente a los receptores expresados en las APCs.

Los niveles de LPS en las diferentes preparaciones fueron, en todos los casos, inferiores a 10^{-7} µg/ml de endotoxina bacteriana.

Se recogieron muestras de sangre a las 6, 8, 12 y 17 semanas y de suero a 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 17 semanas con objeto de analizar la respuesta inmune inducida en los diferentes grupos de animales.

9.4.3. Análisis de proliferación Ag-específica de linfocitos T.

Se sembraron $2,5 \times 10^5$ CMSP por pocillo en placas estériles de 96 pocillos con fondo plano en medio RPMI completo y se incubaron con diferentes concentraciones del AcMo control. Como control negativo las células se cultivaron sólo con medio de cultivo. Como control positivo se utilizaron CMSP activadas con 0,5 µg/ml de concanavalina A. Tras 4 días de cultivo a 37°C con una atmósfera al 5% CO₂, se añadió 1 µCi de ³H-timidina por pocillo, cuantificándose la incorporación de ³H-timidina 18 horas después en un contador de centelleo.

9.4.4. Estudio de la respuesta humoral.

Para la obtención de los sueros, la sangre de los animales se mantuvo 24 horas a 4°C para favorecer la formación del coágulo. Después se centrifugó 15 minutos a 250 X g y se recogieron los sueros. La presencia de anticuerpos frente a Igs de ratón en los sueros de los animales inmunizados con los AcMos de interés se determinó mediante ELISA. Para ello se tapizaron placas de 96 de fondo plano *polysorp* con 5 µg/ml del AcMo irrelevante (ver tabla 1) diluido en PBS durante 24 horas a 4°C. Tras 6

lavados en PBS 0,5% Tween 20, las placas se bloquearon con PBS 1% BSA durante 1 hora a 37°C. Después de lavar, se realizó una incubación con diferentes diluciones de los sueros durante 1 hora a TA. A continuación las placas se lavaron y se añadieron los anticuerpos secundarios específicos para Igs de cerdo. Para detectar en los sueros las Igs de isotipo IgG, IgM e IgA se utilizaron anticuerpos policlonales generados en cabra unidos a HRP (Serotec, Reino Unido). Las subclases de IgG (IgG₁ e IgG₂) se detectaron utilizando los AcMos K139-3C8 y K68-1G2 respectivamente (ver tabla 1). Estos AcMos estaban marcados con biotina, siendo necesaria una incubación adicional con estreptavidina conjugada a la HRP (Pierce, EE.UU). Estas incubaciones se realizaron durante 1 hora a TA, y tanto los sueros como los anticuerpos se diluyeron en PBS 0,1% BSA 0,5% Tween 20. Como control negativo se realizó el mismo protocolo en ausencia de suero. El revelado se realizó siguiendo el mismo protocolo que se describe en el apartado 3.2.

10. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE scFv.

10.1. Producción de los scFv.

10.1.1. Extracción de RNA total.

El RNA de los hibridomas productores de los AcMos 3B11, 2A10 y 1D9 (ver tabla 1) se aisló utilizando una mezcla de tiocianato de guanidina y fenol (*Tripure Isolation Reagent*, Roche Diagnostics, Alemania) (Chomczynski et al, 1987), el cual permitió la lisis celular y la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas. Se añadió 1 ml de reactivo por cada $5-10 \times 10^6$ células y, tras 5 minutos de incubación a TA, se añadieron 200 μ l de cloroformo por cada ml de Tripure. Se centrifugó a 15000 X g durante 15 minutos a 4°C y se obtuvieron tres fases. Se recogió la fase superior, que contenía el RNA, y se precipitó con isopropanol durante 10 minutos. Tras centrifugar a 20000 X g durante 10 minutos, se lavó con etanol puro para eliminar las sales. El RNA se secó y se disolvió en agua libre de RNAsas tratada con dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma, EE.UU.).

10.1.2. Obtención de cDNA.

El RNA se desnaturalizó calentándolo a 65°C durante 2 minutos, evitando su posterior renaturalización manteniéndolo en hielo. La retrotranscripción del RNA total (de 1 a 4 μ g) se realizó durante 1 hora a 37°C con 0,5 U/ μ l de transcriptasa reversa MMLV (Epicentre Technologies, EE.UU.) en una solución con 50 mM de Tris-HCL (pH 8,6), 75 mM de KCl, 10 mM de $MgCl_2$, 10 mM de DTT (Epicentre Technologies, EE.UU.), 125 μ M de cada uno de los dNTPs (Epicentre Technologies, EE.UU.), 0,4 U/ μ l del inhibidor de RNAsas (*RNasin inhibitor*, Promega, EE.UU.), 20 pmoles del oligonucleótido poli dT en H_2O .

10.1.3. Clonación de los segmentos de cDNA que codifican los dominios VH y VL de los AcMo.

Los segmentos de cDNA que codifican los dominios variables de la cadena pesada (V_H) y la ligera (V_L) de cada uno de los AcMos fueron amplificados mediante PCR a partir del cDNA obtenido previamente. Como cebadores se usaron oligonucleótidos degenerados en el extremo 5' (Ver Tabla 2), diseñados para hibridar con la mayoría de las secuencias líder de los segmentos variables de las Igs murinas. Los oligonucleótidos utilizados en el extremo 3' (ver tabla 2), hibridan al inicio de los segmentos

correspondientes a las secuencias de los dominios constantes de la cadena pesada (C_H1) y de la cadena ligera (C_L), respectivamente (Morrison, 2002; Munoz et al., 1998).

Cebador	Secuencia	Referencia	$T_F(^{\circ})$
5'V_H1 1D9	GGGGATATCCACCATGG(A/G)ATG(C/G) AGCTG(T/G)GT(C/A)AT(C/G)CTCTT	(Munoz et al., 1998)	73°C
5'V_L1 1D9	GGGGATATCCACCATGG(A/G)CAG(G/A) CTTAC(T/A)T(C/T)(T/C)	(Morrison, 2002)	76°C
5'V_H1 2A10	GGGGATATCCACCATGG(A/G)ATG(C/G) AGCTG(T/G)GT(C/A)AT(C/G)CTCTT	(Munoz et al., 1998)	73°C
5'V_L1 2A10	GGGGATATCCACCATGGAGACAGACACA CTCCTGCTAT	(Munoz et al., 1998)	73°C
5'V_H1 3B11	GGGGATATCCACCATG(A/G)ACTTCGGG (T/C)TGAGCT(T/G)GGTTTT	(Munoz et al., 1998)	73°C
5'V_L1 3B11	GGGGATATCCACCATG(G/T)CCC(A/T) (G/A)CTCAG(C/T)T(C/T)CT(T/G)GT	(Munoz et al., 1998)	73°C

3'V_H1	AGGTCTAGAA(G/A)CTCCACACACAGG (T/C)(T/C)CCAGTGGATAGAC	(Munoz et al., 1998)	74°C
3'V_L1	GGGTCTAGAACTGGATGGTGGGAAGAT GGA	(Munoz et al., 1998)	69°C

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes que codifican los segmentos V_H y V_L de cada uno de los AcMos seleccionados. Los nucleótidos (nts) que se encuentran entre paréntesis representan las dos posibles combinaciones en una misma posición. (*TF calculada considerando un %GC promedio)

La amplificación se realizó con 0,04 U/μl de una polimerasa termoestable (*DyNAzyme II DNA Polymerase* F-501L, Finnzymes, Finlandia) en una mezcla de reacción que constaba de 10 pmoles de cada oligonucleótido, 50 μM de cada dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 0,005% Tween 20 y 0,005% de NP-40.

Para cada pareja de oligonucleótidos se optimizó empíricamente la cantidad de $MgCl_2$ (entre 0,5 y 2 mM). La T_{AN} con la que se amplificó cada uno de los insertos fue 5°C menor a la T_F más baja de cada pareja de oligonucleótidos. Las condiciones en las que se realizó la PCR se recogen en la tabla 3. Para calcular la T_F se aplicó la siguiente fórmula:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	3 min	1
95°C	1 min	30
T_{AN}	1 min	
72°C	2 min	1
95°C	1 min	
T_{AN}	1 min	1
72°C	10 min	

Tabla 3. Condiciones de PCR empleadas para la amplificación de la V_H y la V_L de cada uno de los AcMos

$$T_F = 69,3 + 0,41 \times (\%GC)^* - (680 / \text{tamaño oligonucleótido en nts})$$

*%GC: contenido de los nucleótidos guanina y citosina relativo al número de nucleótidos totales del cebador expresado en %.

10.1.4. Obtención de las construcciones que codifican los scFv de los AcMos unidas al gen gfp.

Se diseñaron, para cada uno de los cDNAs de los AcMos, oligonucleótidos específicos para los genes de la cadena pesada (5' V_{H2} y 3' V_{H2}) y ligera (5' V_{L2} y 3' V_{L2}), incluyéndose en los oligonucleótidos 3' V_{H2} y 5' V_{L2} un segmento adicional con secuencias complementarias en los extremos, que codifica el péptido de unión $(Gly_4Ser)_3$. Además, en este caso, los cebadores 5' V_{L2} , 3' V_{H2} y 3' V_{L2} apareaban dentro de las secuencias que codificaban para los segmentos variables, eliminando así del cDNA final las secuencias que codificaban el péptido señal de la V_L y los dominios C_{H1} y C_L respectivamente. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se muestran en la tabla 4.

Cebador	Secuencia	T _F (*)
5'V_H 2 1D9	GGGGATATCCACC ATG GAAATGGAGCTGGG TCATGCTCTT	74°C
3'V_H 2 1D9	<u>CCTCCAGAACCTCCGCCTCCTGATCCGCCAC</u> CTCCTGAGGAGACGGTGACTGAGG	Zona apareada: 75°C
		84°C
5'V_L 2 1D9	<u>CAGGAGGCGGAGGTTCTGGAGG</u> AGGTGGG AGTCATGGGGACATTGTGATGT	Zona apareada: 67°C
		80°C
3'V_L 2 1D9	GAGCATCAGCCCGTTTTAATTCCAACCTT	63°C

5'V_H 2 2A10	GGGGATATCCACC ATG GGATGGAGCTGGGT CATGCTCTT	75°C
3'V_H 2 2A10	<u>CCTCCAGAACCTCCGCCTCCTGATCCGCCAC</u> <u>CTCCTGAGGAGACAGTGAGAGTGG</u>	Zona apareada: 58°C
		83°C
5'V_L 2 2A10	<u>CAGGAGGCGGAGGTTCTGGAGG</u> AGGTGGG AGTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTG	Zona apareada: 73°C
		83°C
3'V_L 2 2A10	GGGCAGCATCAGCCCGGTTTATCTCCAACCTT	71°C

5'V_H 2 3B11	GGGGATATCCACC ATG GACTTCGGGCTGAG CTGGGTTT	76°C
3'V_H 2 3B11	<u>CCTCCAGAACCTCCGCCTCCTGATCCGCCAC</u> CTCCTGAGGAGACTGTGAGAGTGG	Zona apareada: 74°C
		83°C
5'V_L 2 3B11	<u>CAGGAGGCGGAGGTTCTGGAGG</u> AGGTGGG AGTCAAATTGTTCTCACCCAGTC	Zona apareada: 67 °C
		80°C
3'V_L 2 3B11	GAGCATCAGCCCGTTTCAGCTCCAGCTTG	71°C

Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados para la fusión de las secuencias que codifican los segmentos V_H y V_L de cada uno de los AcMos seleccionados. Los nts en negrita muestran el codón de iniciación de la secuencia que codifica la V_H y los nts subrayados son los que codifican el péptido de unión, es decir, la zona del cebador que no aparee con el DNA. (*) En la tabla se muestra la T_F del cebador completo y la T_F de la zona del oligonucleótido que aparee con la secuencia V_H o V_L correspondiente.

La amplificación se llevó a cabo utilizando la misma polimerasa y la misma mezcla de PCR que las empleadas para obtener los segmentos de las cadenas por separado. Además, se facilitó la hibridación de los oligonucleótidos con la secuencia de DNA mediante 5 ciclos previos de amplificación en los cuales la T_{AN} estaba determinada por la T_F correspondiente a la zona del oligonucleótido que aparea con la secuencia ($T_{AN \text{ zona apareada}}$) (ver tabla 5).

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	3 min	1
95°C	45 s	5
$T_{AN \text{ zona apareada}}$	30 s	
72°C	45 s	
95°C	45 s	25
T_{AN}	30 s	
72°C	45 s	
95°C	45 s	1
T_{AN}	30 s	
72°C	10 min	

Tabla 5. Condiciones de PCR empleadas para añadir en los insertos la secuencia que codifica el péptido de unión.

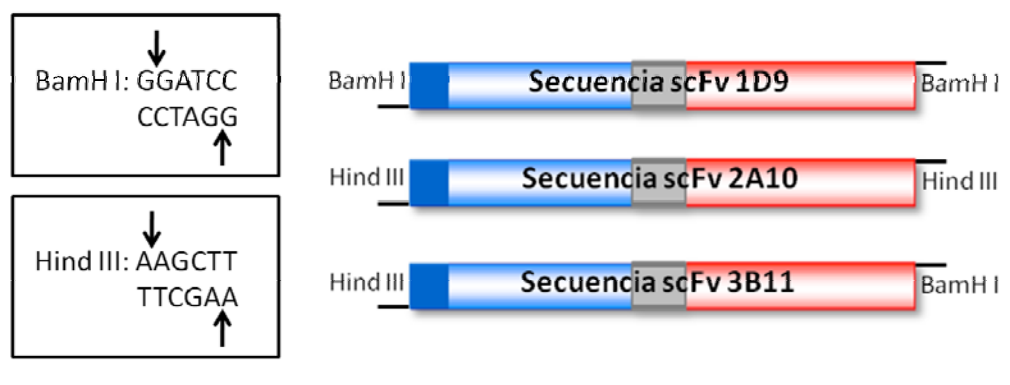
Con objeto de ensamblar los dos insertos para la obtención de la secuencia V_H -péptido de unión- V_L (scFv, *single chain Fv*) se llevó a cabo una *PCR recombinante* con cantidades equivalentes de cada uno de los cDNA. Esta *PCR recombinante* constó de 7 ciclos iniciales en ausencia de oligonucleótidos durante los cuales los segmentos solapantes correspondientes al V_H -péptido de unión y V_L -péptido de unión, hibridan entre sí (Munoz et al., 1998), actuando como cebador el uno del otro. Después de este proceso de ensamblaje se realizó la amplificación utilizando los oligonucleótidos externos 5' V_H2 y 3' V_L2 (ver tabla 6).

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Ensamblaje	94°C	30 s	7
	55°C	30 s	
	72°C	1 min	
Amplificación	94°C	5 min	1
	95°C	45 s	35
	T _{AN}	30 s	
	72°C	45 s	
	72°C	10 min	1

Tabla 6. Condiciones de PCR empleadas para generar los fragmentos scFv.

10.1.5. Obtención de las secuencias que codifican los scFv de los AcMos unidas al ORF7 del virus del SRRP.

Utilizando el programa informático *Sequence Manipulation Suite: Restriction Map* (creado por Stothard, P en la Universidad de Alberta, Edmonton, Canada y disponible en Internet desde http://www.bioinformatics.org/sms2/rest_map.html) se estudiaron las dianas de restricción que existían en el extremo 5' de la secuencia de la spORF7 del plásmido (ver apartado 10.1.8. de material y métodos) y se seleccionaron algunas de aquellas que no aparecieran dentro de las secuencias que codifican los scFv. Las secuencias de las dianas de restricción seleccionadas fueron las siguientes:



Se diseñaron nuevos oligonucleótidos (ver tabla 7) para cada una de las construcciones, en los que se añadieron las dianas de restricción necesarias para poder clonarlas en el plásmido que contiene la secuencia del ORF7 del virus del SRRP (ver apartado 10.1.8. de material y métodos).

Cebador	Secuencia	T _F (*)
5' scFv1D9ORF7	GCGC <u>GGATCC</u> ATG CTCTTCCTGATG GCGGTGG	Zona apareada: 64°C
		76°C
3' scFv1D9ORF7	AAAGTTGGAATTAAACGGGCTGATG CT <u>GGATCC</u> GCGC	Zona apareada: 62°C
		73°C
5' scFv2A10ORF7	GCGCAAGCTT ATG GGATGGAGCTGG GTCATGCTCT	Zona apareada: 66°C
		74°C
3' scFv2A10ORF7	GCGCAAGCTTAGCATCAGCCCGGTTT ATCTCCAACTT	Zona apareada: 65°C
		73°C
5' scFv3B11ORF7	GCGCAAGCTT ATG GACTTCGGGCTG AGCTGGGTTTT	Zona apareada: 66°C
		74°C
3' scFv3B11ORF7	GCGC <u>GGATCC</u> AGCATCAGCCCGTTTC AGCTCCAGCTTGG	Zona apareada: 71°C
		79°C

Tabla 7. Oligonucleótidos diseñados para el clonaje de las secuencias que codifican los scFv en el plásmido que contiene la secuencia del ORF7 del virus del SRRP. Los nts en negrita muestran el codón de iniciación de la secuencia y los nts subrayados se corresponden con las dianas de restricción que se han añadido en las secuencias que codifican los scFv. (*) En la tabla se muestra la T_F del cebador completo y la T_F de la zona del oligonucleótido que aparece con la secuencia.

Las dianas de restricción se incorporaron a las secuencias que codifican los correspondientes scFv mediante una PCR cuyas condiciones se muestran en la tabla 8.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	5 min	1
95°C	45 s	5
T _{AN} zona apareada	45 s	
72°C	45 s	
95°C	45 s	25
T _{AN}	45 s	
72°C	45 s	
72°C	10 min	1

Tabla 8. Condiciones de PCR empleadas para añadir las dianas de restricción a las secuencias que codifican los scFv.

10.1.6. Análisis de los productos de PCR.

Una vez obtenido el fragmento de DNA por PCR, se mezcló un volumen de 10 µl del producto de cada PCR con 1 µl de tampón de muestra 10X (20% de Ficoll 400 (Merk, Alemania), 0,025% de *Orange G* (Sigma, EE.UU.) y 100mM de EDTA). Las muestras así preparadas se cargaron en diferentes pocillos de un minigel de agarosa (Promega, EE.UU.) al 1% ó 1,5% según el tamaño esperado del fragmento de DNA, en TAE (0,04 M de Tris Acetato y 0,001 M de EDTA) con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (Sigma, Alemania). En un pocillo contiguo se cargaron los marcadores de tamaño conocido (*100 bp DNA Ladder*, Invitrogen EE.UU; *1Kb DNA Ladder*, Invitrogen, EE.UU.). Como tampón de electroforesis se utilizó TAE. Las electroforesis se realizaron a 90 V durante 45 minutos y los geles se observaron y fotografiaron bajo la luz ultravioleta.

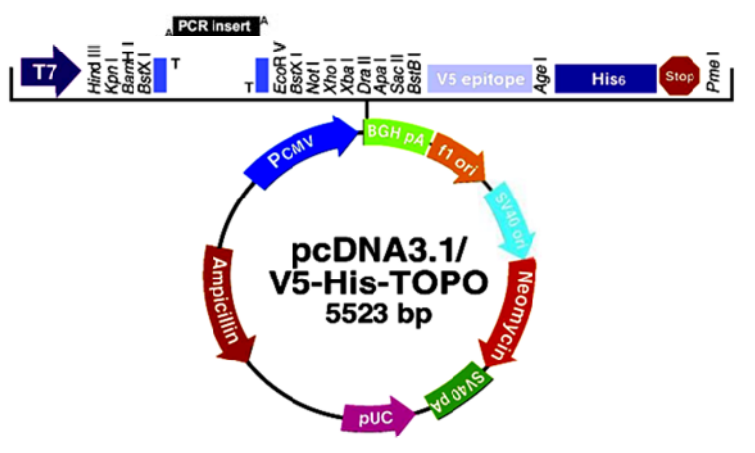
10.1.7. Aislamiento de DNA desde agarosa.

Para purificar los productos específicos de las PCR, las muestras se prepararon mezclando todo el producto de PCR con el volumen necesario de tampón de muestra 10X y se cargaron en los pocillos de un minigel de agarosa de bajo punto de fusión (Promega, EE.UU.) al 1% ó 1,5% según el tamaño esperado del fragmento de DNA, en TAE con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. En un pocillo contiguo se cargaron los marcadores de peso

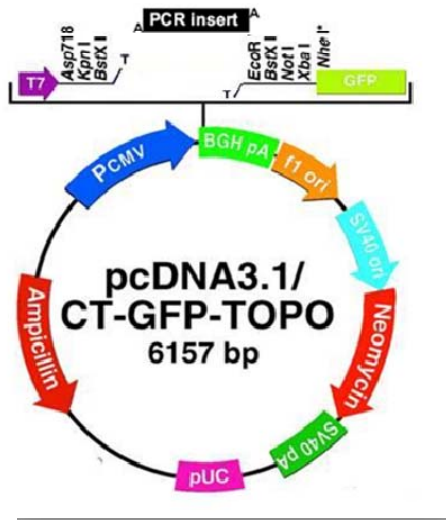
molecular conocido. La electroforesis se realizó a 50 V utilizando como tampón de electroforesis TAE 1X y se observó bajo la luz ultravioleta. Se cortó la banda de interés y se procedió al aislamiento de DNA utilizando el *QUIAquick gel extration kit* (Quiagen, Alemania) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

10.1.8. Plásmidos.

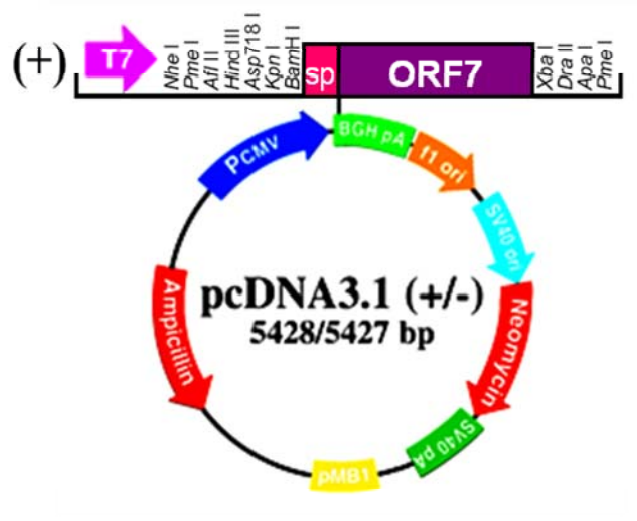
Para el clonaje de los diferentes fragmentos de DNA obtenidos para la generación de los scFv se utilizaron diferentes plásmidos. El vector pcDNA3.1/V5-His TOPO (Invitrogen, EE.UU.) se utilizó para el clonaje de los fragmentos que codifican las V_H y V_L de cada uno de los AcMos. Este plásmido lleva unido covalentemente una topoisomerasa (vector *activado*) que estabiliza el complejo y, gracias a su actividad ligasa, puede insertar directamente el producto de la PCR. Además, la zona en la que el plásmido aparece abierto contiene residuos T que son complementarios a la adenina que añade la polimerasa en el producto de PCR.



El plásmido pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO (Invitrogen, EE.UU.) también es un vector *activado*, por lo que permite el clonaje de fragmentos amplificados por PCR directamente. Además este plásmido lleva incorporada la secuencia que codifica para la proteína GFP de tal manera que si la incorporación del inserto al plásmido se produce correctamente, se genera una proteína de fusión del fragmento clonado con la GFP en el extremo C-terminal, lo que facilita la detección de su expresión. En este plásmido se clonaron los fragmentos que codifican los scFv de cada uno de los AcMos.



La secuencia ORF7 del virus del SRRP había sido clonada previamente en nuestro laboratorio en el plásmido pcDNA 3.1 (+) (Invitrogen, EE.UU.) entre las dianas de restricción BamHI y XbaI del sitio de clonación del plásmido. Esta secuencia aparece precedida por un espaciador (sp).



10.1.9. Digestión.

Las digestiones de los distintos plásmidos y fragmentos de PCR se realizaron con las correspondientes enzimas de restricción (Hind III y Bam HI, Roche, Alemania.) siguiendo las recomendaciones descritas para cada una de ellas. En el caso de las digestiones simples se realizó un tratamiento con fosfatasa alcalina (*rAPID Alkaline Phosfatase*, Roche, EE.UU.) durante 20 minutos a 37°C y una posterior incubación de 15 minutos a 65°C.

Posteriormente, tanto los insertos como los plásmidos fueron purificados en geles de agarosa de bajo punto de fusión como se describe en el apartado 10.1.7.

10.1.10. Ligación.

Para incorporar las secuencias que codifican las V_H y V_L de los AcMos en el plásmido pcDNA3.1/V5-His TOPO y cada secuencia que codifica el scFv en el plásmido pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO se mezcló el DNA purificado (ver apartado 10.1.7.) con el plásmido correspondiente y una solución salina suministrada en el *kit* siguiendo las recomendaciones del fabricante. La mezcla se incubó a TA durante 5 minutos.

Para las ligaciones realizadas con los DNA de las secuencias que codifican cada uno de los scFv y el plásmido spORF7 previamente digeridos, se utilizó la Ligasa T4 (Promega, EE.UU.). La relación inserto:vector varió en todos los caso de 1:1 a 1:3 y la cantidad de plásmido fue de 50 ó 100 ng. La reacción se realizó a 16°C durante 18 horas, tras lo cual se procedió a la transformación de bacterias competentes.

10.1.11. Transformación de bacterias competentes.

Se realizó la transformación de bacterias competentes TOP10 (Invitrogen, EE.UU.) mediante choque térmico. Para ello, se descongelaron las bacterias en hielo, se añadió el plásmido y se incubó durante 25 minutos en hielo. Seguidamente se mantuvieron 30 segundos a 42°C e, inmediatamente después, se pasaron a hielo durante 2 minutos. Tras añadir a las bacterias el medio SOC (12 g/l de bactotripton, 24 g/l de extracto de levadura, 0,5 g/l de NaCl, 4 ml/l de glicerol, 2,5 mM de KCl y 2mM $MgCl_2$) (Invitrogen, EE.UU.), éstas se incubaron 1 hora a 37°C en agitación. A continuación se sembraron en placas de LB (5 g/l de bactotripton (Becton Dickinson, Francia), 2,5 g/l de extracto de levadura (Serva, Alemania), 5 g/l de NaCl) con ampicilina (1mg/l) (Sigma, Alemania) y se incubaron durante 18 horas en una estufa a 37°C.

10.1.12. Selección de colonias.

Para seleccionar las bacterias que contenían el plásmido con el inserto correctamente orientado, se aislaron varias colonias resultantes de las transformación, y se resuspendieron por separado en 20 μ l de la mezcla

reacción de PCR correspondiente a cada DNA; además, para poder recuperar las bacterias seleccionadas, también se creció una réplica de cada colonia. Las condiciones de la reacción se detallan en la tabla 9.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	10 min	1
95°C	1 min	30
T _{AN}	1 min	
72°C	2 min	
95°C	1 min	1
T _{AN}	1 min	
72°C	10 min	

Tabla 9. Condiciones de PCR empleadas para seleccionar las colonias de bacterias positivas.

Dependiendo de la construcción con la que se hubiesen transformado las bacterias, se utilizaron los oligonucleótidos T7 y BGH *reverse*, los cuales hibridan en el plásmido a ambos lados del sitio de clonaje, o los cebadores que hibridan en la secuencia que codifica la GFP o el ORF7 combinados con los oligonucleótidos correspondientes al extremo 5' de cada inserto. Las secuencias de estos cebadores aparecen en la Tabla 10.

Cebador	Secuencia	T _F
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	53°C
BGH reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG	56°C
GFP reverse	GGGTAAGCTTTCCGTATGTAG	57°C
ORF7 reverse	GCGCTCTAGAAAATTAAGTGCACCCTGACTGGCGG	73°C

Tabla 10. Secuencias y temperaturas de fusión de los oligonucleótidos utilizados para seleccionar las colonias de bacterias positivas.

10.1.13. Extracción y purificación de plásmidos.

Para la extracción de los diferentes plásmidos se utilizó el *kit QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen, Alemania), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. A partir de cultivos de bacterias de 3 ml en LB con 50 µg/ml de

ampicilina se obtuvieron 30 µl de plásmido a una concentración de 200 a 400 µg/ml.

La obtención de grandes cantidades de plásmido libre de endotoxinas para la inoculación de los cerdos, se realizó con el *kit EndoFree Plasmid Giga* (Quiagen, Alemania), aplicando el protocolo indicado por el fabricante. A partir de un cultivo de 2,5 l de bacterias en medio LB se obtuvieron aproximadamente 7 mg de plásmido.

10.1.14. Secuenciación.

La secuenciación se realizó en el laboratorio del Servicio Interdepartamental de Investigación (Universidad Autónoma de Madrid) o en Secugen S.L. (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid). La identidad de las secuencias y la ausencia de mutaciones se comprobaron mediante análisis informático (*Chromas*, desarrollado por Conor McCarthy en la Universidad Queensland, Australia y disponible en Internet desde <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) y en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Para comprobar que las proteínas resultantes de cada una de las secuencias no contenían ningún codón de terminación y que estaban en fase con la secuencia de la gfp o con la secuencia del ORF7, el DNA se tradujo a proteína utilizando el programa *Wingen* (desarrollado por Lars Henning en la Universidad de Friburgo, Alemania y disponible en Internet desde <http://www.biologie.uni-freiburg.de/data/schaefer/lhennig/winpep1.html>).

La presencia de péptido señal se predijo utilizando el servidor *SignalP 3.0* de la Universidad Técnica de Dinamarca (DTU) aplicando el modelo de predicción eucariota HMM (*Hidden Markov models*).

10.2. Generación de líneas celulares estables para la producción de proteínas recombinantes.

Con objeto de obtener las proteínas recombinantes se realizaron transfecciones con los diferentes plásmidos en células de ovario de hamster chino (CHO) utilizando *LipofectAMINE PLUS Reagent* (Invitrogen, EE.UU.). Las células se sembraron en placas estériles de 6 pocillos (Labclinics, España) en DMEM suplementado con 30 µg/ml de gentamicina, 2mM de L-glutamina y 5% de SFB. La transfección se llevó a cabo cuando las células

alcanzaron un 80% de confluencia, con cantidades de plásmido que variaron entre 200-400 ng por pocillo. Las células se cultivaron durante 24 horas a 37°C con 5% de CO₂ y se procedió a analizar la expresión de la proteína correspondiente. Para ello se realizó un tratamiento de 4 horas con 2 µg/ml de monensina (Sigma, EE.UU), con el objeto de inhibir la secreción de la proteína al medio extracelular. Pasado ese tiempo, las células se despegaron con PBS 10 mM EDTA y se llevó a cabo el análisis de la proteína de fusión mediante citometría de flujo. En el caso de los scFv unidos a la proteína GFP, la fluorescencia se detectó directamente o, en algunos casos, las células fueron incubadas durante 30 min con un anticuerpo anti-GFP generado en conejo marcado con Alexa 488 (Molecular Probes (EE.UU.)). Para ello las células fueron previamente permeabilizadas durante 15 min con metanol a -20°C. Para detectar la nucleoproteína del virus del SRRP (proteína N), se siguió el protocolo de permeabilización previamente descrito y se utilizó el AcMo anti-proteína N (1CH5, Ingenasa, España), el cual, tras dos lavados en TF, se reveló con un anticuerpo de conejo anti-Ig de ratón unido a PE o a FITC. En todos los casos el control negativo empleado fueron células CHO no transfectadas, tratadas siguiendo el mismo procedimiento.

Para la obtención de las 7 líneas estables que fueron generadas, las células transfectadas se seleccionaron con geneticina (0,8 mg/ml) (Gibco, Gran Bretaña) y se clonaron por dilución límite.

10.3. Western Blot.

Las células CHO transfectadas con los plásmidos se trataron durante 4 horas con 2 µg/ml de monensina para inhibir la secreción de las proteínas recombinantes al medio extracelular. Posteriormente se incubaron en tampón de lisis (10mM de Tris-HCl, 1mM de EDTA, 1% de NP40 pH 7,4, 1 mg/ml de seroalbúmina bovina, 1mM de PMSF y 10 µg/ml de aprotinina) durante 20 min en hielo. Tras centrifugar los lisados, las proteínas que quedaron en el sobrenadante se mezclaron con tampón de carga (0,062 M de Tris-HCl pH 6,8, 2% de SDS, 10% de glicerol, 0,001% de azul de bromofenol) y se calentaron a 95°C durante 5 minutos. Las muestras se cargaron en geles SDS-PAGE de diferentes porcentajes de poliacrilamida (Sigma, EE.UU.) y se realizó la electroforesis durante 1h y 30 minutos a 120V en tampón de electroforesis (25mM de Tris-HCl pH 7, 192 mM de

glicina y 0,1% de SDS). Las proteínas así separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, EE.UU.) en tampón de transferencia (25 mM de Tris HCl pH 8,3, 192 mM de Glicina y 20% de Metanol), a 250 mA durante 75 minutos a 4°C. A continuación se bloquearon los sitios de unión inespecífica de las membranas sumergiéndolas en una solución de PBS 3% BSA durante toda la noche a 4°C. Tras 3 lavados con PBS 1% BSA 0,2% Tween 20, las membranas se incubaron, dependiendo de la construcción, durante una hora con el AcMo anti-GFP unido a HRP (Miltenyi Biotec, Alemania) o con un AcMo anti-Proteína N (1AC7, Ingenasa, España), diluidos en el mismo tampón en el que se realizan los lavados. En este último caso se realizó una incubación posterior con un anticuerpo de cabra que se une a Igs de ratón conjugado a HRP (Sigma, EE.UU.).

La actividad peroxidasa se visualizó utilizando un ensayo de ECL (Amersham, Reino Unido). Para determinar los pesos moleculares de las bandas específicas, éstas se compararon con marcadores de peso molecular conocido (*Kaleidoscope Prestained Standards*, Bio-Rad, EE.UU. o *Novex Sharp Protein Standard*, Invitrogen, Alemania).

Los pesos moleculares de las proteínas se calcularon en base a su composición de aminoácidos utilizando el programa informático *WinPep* (desarrollado por Lars Henning en la Universidad de Friburgo, Alemania y disponible en Internet desde <http://www.biologie.uni-freiburg.de/data/schaefer/lhennig/winpep1.html>)

10.4. Funcionalidad y especificidad de los scFv.

El análisis de la capacidad de unión de las proteínas recombinantes scFv 3B11 y scFv 2A10 a la Sn y al CD163 respectivamente, se realizó incubando macrófagos alveolares ($1-2,5 \times 10^5$ por pocillo) durante 30 minutos a 4°C con el sobrenadante de cultivo obtenido de los transfectantes que expresaban dichas moléculas. En el caso de los scFv fusionados a GFP, la fluorescencia de las proteínas recombinantes se detectó directamente, o añadiendo un anticuerpo anti-GFP conjugado con Alexa 488 o un anticuerpo anti-GFP unido a biotina que, tras 2 lavados con TF, se reveló con estreptavidina conjugada con FITC o PE (Beckton Dickinson, EE.UU.). Para detectar los scFv unidos a proteína N, se utilizó AcMo 1CH5 (1µg por pocillo) seguido de un anticuerpo de conejo que reconoce las Igs de ratón conjugado con FITC. Las células se fijaron y se analizaron mediante

citometría de flujo. Como controles negativos se utilizaron sobrenadante de cultivo procedente de células CHO no transfectadas y sobrenadante de cultivo de células CHO transfectadas con la construcción scFv 1D9 fusionadas a GFP o a la proteína N del virus del SRRP.

Las preparaciones de macrófagos alveolares que se marcaron con las construcciones scFv unidas GFP y que fueron reveladas con el anticuerpo policlonal anti-GFP biotina y estreptavidina unida a FITC se centrifugaron a 25g durante 4 minutos sobre un portaobjetos en una centrífuga *Cytospin 3* (Shandon). Estas citoextensiones se dejaron secar a TA y se montaron utilizando *FluorSave Reagent* (Calbiochem, EE.UU.).

La especificidad de la unión de las proteínas recombinantes se evaluó con un ensayo de competición entre dichas proteínas y los AcMos de los que proceden. Para ello los macrófagos alveolares se incubaron 30 minutos a 4°C con los AcMos 3B11, 2A10 o con un AcMo irrelevante. A continuación se añadieron los sobrenadantes de cultivo que contenían las proteínas recombinantes, incubándolos en las mismas condiciones. La detección de la GFP se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente, excepto en algunos experimentos donde se visualizó directamente la fluorescencia de la GFP. La nucleoproteína del virus del SRRP se detectó utilizando el AcMo 1CH5, el cual se reveló con un anticuerpo generado en cabra que reconoce Igs de ratón de isotipo G2b (Invitrogen, EE.UU.). Las células se lavaron con FB, se fijaron y analizaron en el citómetro de flujo.

En ocasiones, para realizar estos experimentos, los sobrenadantes de cultivo fueron concentrados utilizando tubos *Amicon Ultra* (Millipore, Irlanda) con un tamaño de poro que sólo permite pasar moléculas con un peso molecular inferior a 10 kDa.

10.5. Marcaje de secciones de tejidos con las construcciones scFvGFP.

Se realizaron análisis inmunohistoquímicos y de inmunofluorescencia con los sobrenadantes de cultivo correspondientes a las diferentes proteínas recombinantes siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6 de material y métodos. Los tejidos que se utilizaron en las técnicas de inmunofluorescencia se fijaron con metanol frío durante 5 minutos mientras que, en el caso de las inmunohistoquímicas se fijaron con acetona durante 2

minutos. Los sobrenadantes de cultivo se concentraron 30-50 veces en tubos *Amicon Ultra*.

Las secciones se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo anti-GFP biotina, el cual se reveló con un estreptavidina unida a HRP en el caso de las inmunohistoquímicas, y unida a FITC para las inmunofluorescencias.

10.6. Endocitosis de los scFv unidos a GFP.

Estos ensayos se realizaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado 9.1. de material y métodos aunque, en este caso, los macrófagos alveolares fueron incubados una hora a 4°C con los sobrenadantes que contenían los scFv unidos a GFP.

11. Estudio *in vivo* del efecto de dirigir Ag a la Sn en un modelo de inmunización con DNA.

11.1. Modelo experimental.

Con objeto de evaluar la eficacia de los fragmentos scFv unidos a un Ag como vacuna de DNA se seleccionó, como vector para dirigir Ag a las APCs, el scFv 3B11. Para este estudio se inmunizaron cerdos con los plásmidos que codifican la proteína recombinante scFv 3B11-proteína N, el scFv control fusionado a proteína N o la nucleoproteína sola. Se comparó la respuesta celular obtenida al estimular las CMSP de los diferentes grupos de cerdos con el virus del SRRP, así como la presencia de anticuerpos frente a la proteína N en los sueros de dichos animales.

11.2. Inmunizaciones.

Para el experimento de vacunación genética se utilizaron 20 cerdos *Large White* de 2-3 meses de edad. Los cerdos se inocularon con los diferentes plásmidos (plásmido vacío, spORF7, scFv 1D9 ORF7 y scFv 3B11 ORF7; n=5/grupo) en el músculo dorsal, realizándose tres inmunizaciones i.m. sin adyuvante, con un intervalo de 14 días entre cada una de ellas. Para cada una de las dosis se utilizaron 500 µg de los respectivos plásmidos en 1ml de solución salina. Los plásmidos se purificaron utilizando el *kit EndoFree Plasmid Giga* (Ver apartado 10.1.13).

Se recogieron muestras de sangre a las 4, 6, 8 y 11 semanas y de suero a 0, 2, 4, 6, 7, 8 y 11 semanas con objeto de analizar la respuesta inmune inducida en cada caso frente a la nucleoproteína del virus del SRRP.

Dos semanas después de la última inoculación (semana 6) se inmunizó a los cerdos por vía i.m. con una vacuna inactivada frente al virus del SRRP, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Progresis, Laboratorios Merial, España).

11.3. Análisis de proliferación Ag-específica de linfocitos T.

Se sembraron por cuádruplicado 3×10^5 CMSP por pocillo en placas estériles de 96 pocillos con fondo plano y se estimularon con diferentes concentraciones del virus del SRRP (cepa 5710), desde una MOI de 0,7 hasta una MOI de 0,0008, haciendo diluciones 1/3. Como control negativo se incubaron estas células con sobrenadante de cultivo de células MARC-145 sin infectar.

Tras 4 días en cultivo a 37°C en una atmósfera al 5%CO₂, las células se pulsaron con 1 µCi por pocillo de ³H-timidina (Perkin Elmer, EE.UU). La incorporación de ³H-timidina se cuantificó 18 horas después en un contador de centelleo.

11.4. Estudio de la respuesta humoral.

La presencia en los sueros de estos animales de anticuerpos específicos frente la nucleoproteína de virus del SRRP se detectó mediante ELISA. Para ello se utilizaron placas de 96 pocillos de fondo plano tapizadas con la proteína N del virus (Ingenasa, España) a las que se añadieron una dilución 1/10 de los sueros procedentes de los diferentes grupos de cerdos. Para llevar a cabo estas diluciones se mezcló en una relación 1:1 tampón de ELISA (PBS 0,1%BSA 0,5% Tween 20) y extracto de E.coli, el cual se obtuvo sonicando estas bacterias. Después de una hora de incubación a 37°C y tras varios lavados, se añadió el anticuerpo secundario frente Igs de cerdo, el cual se incubó durante 45 minutos a TA y se reveló con una solución sustrato durante 15 minutos a TA. Todos los reactivos fueron suministrados por el *kit Ingezim PRRS Europa* (Ingenasa, España). Como control negativo se empleó tampón de dilución de las muestras.

La absorbancia de la reacción se cuantifico a una longitud de onda de 405 nm y los datos obtenidos se expresaron como D.O.

12. ESTADÍSTICA.

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa informático *GraphPad Prism versión 4.00* (disponible en Internet desde www.graphpad.com). Los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo* se analizaron utilizando el test estadístico no paramétrico de Mann-Whitney. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

RESULTADOS

RECEPTORES Sn, CD163 Y TLR2 COMO DIANAS A LAS QUE DIRIGIR Ag PARA AUMENTAR SU INMUNOGENEICIDAD.

En la primera parte de esta tesis hemos estudiado el patrón de expresión y la distribución en órganos linfoides secundarios de los receptores Sn, CD163 y TLR2. Además hemos analizado su capacidad endocítica y de actuar como receptores a los que dirigir Ags con objeto de mejorar su presentación a los linfocitos.

1. Análisis del patrón de expresión y de la capacidad endocítica de las moléculas Sn, CD163 y TLR2.**1.1. Patrón de expresión.**

Del panel de AcMos del que disponíamos en el laboratorio frente a diferentes moléculas de superficie expresadas en células del sistema inmune, se seleccionaron aquellos que reconocían los receptores Sn, CD163 y TLR2, todos ellos expresados en poblaciones celulares con capacidad para actuar como APCs en la especie porcina y en otras especies.

En el momento de comenzar este trabajo ya se disponía de datos sobre el patrón de expresión en el cerdo del CD163 (Chamorro et al., 2000; Sanchez et al., 1999) y del TLR2 (Alvarez et al., 2008; Tohno et al., 2005) Sin embargo no se había estudiado qué poblaciones celulares expresaban la Sn porcina, por lo que en primer lugar analizamos la presencia de esta molécula en MoDCs, células sanguíneas y macrófagos alveolares.

Para realizar este estudio se emplearon sobrenadantes de cultivo de los hibridomas productores de dos AcMo anti-Sn (clones 3B11 y 1F1). Estos hibridomas procedían de fusiones independientes en las que, como inmunógeno, se utilizaron macrófagos y MoDCs respectivamente. Ambos AcMos se unen a la molécula de Sn porcina, aunque reconocen diferentes epítomos de la misma (Revilla et al., 2009). La expresión de Sn se detectó en macrófagos alveolares y MoDCs, mientras que fueron negativos para la expresión de dicha molécula los linfocitos, monocitos y granulocitos (ver figura 10).

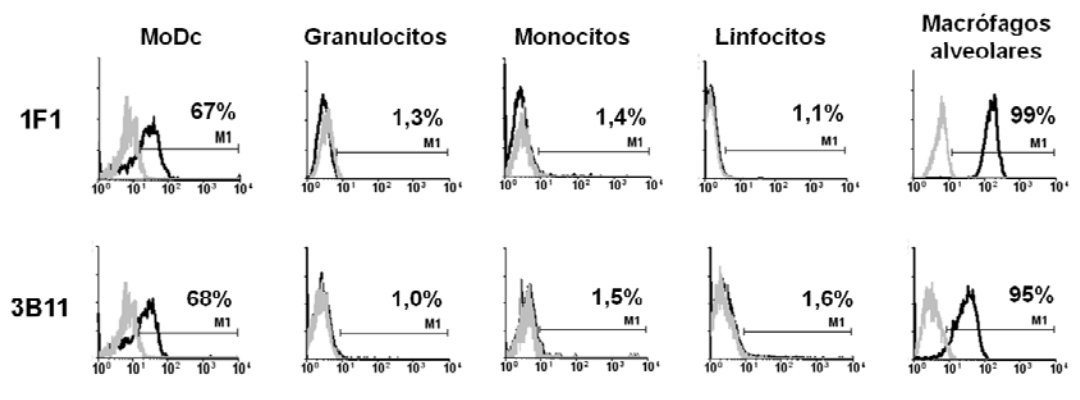


Figura 10. Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de la molécula de Sn.

Las diferentes poblaciones celulares se marcaron con los AcMos 1F1 y 3B11 (histogramas en negro) o con un AcMo irrelevante del mismo isotipo (histograma gris), y se revelaron con un anticuerpo generado en conejo que reconoce Igs de ratón marcado con FITC. Los valores corresponden al porcentaje de células positivas para este receptor. Estos resultados son representativos de cinco experimentos independientes.

1.2. Regulación de Sn por citoquinas.

Como se demostró en el apartado anterior, en condiciones basales los monocitos porcinos no expresan Sn, al igual que ocurre en el hombre y en el ratón (Crocker and Gordon, 1989; Hartnell et al., 2001). Sin embargo su expresión puede inducirse mediante el cultivo de dichas células con citoquinas u otros factores de diferenciación, habiéndose descrito diferencias entre especies (Crocker et al., 1988; Hartnell et al., 2001; McWilliam et al., 1992; van den Berg et al., 1996). Por ello decidimos estudiar el efecto de diferentes citoquinas y del suero homólogo en la modulación de esta molécula en monocitos porcinos. Los monocitos se aislaron a partir de CMSP y se cultivaron durante 24 y 48 horas en presencia de los diferentes estímulos o sólo con medio de cultivo. Después de 24 horas, el IFN α reguló positivamente la expresión de la molécula de Sn, siendo positivas para este receptor aproximadamente un 80% de las células y manteniéndose esta expresión al menos durante 48 horas. También se detectó la expresión de Sn en el 30-40% de los monocitos cultivados con suero de cerdo, observándose en este caso una mayor intensidad en la expresión de la Sn tras 48 horas en cultivo con este

estímulo. Sin embargo la IL4, la IL10 y el IFN γ no mostraron ningún efecto en la expresión de dicha molécula. (ver figura 11).

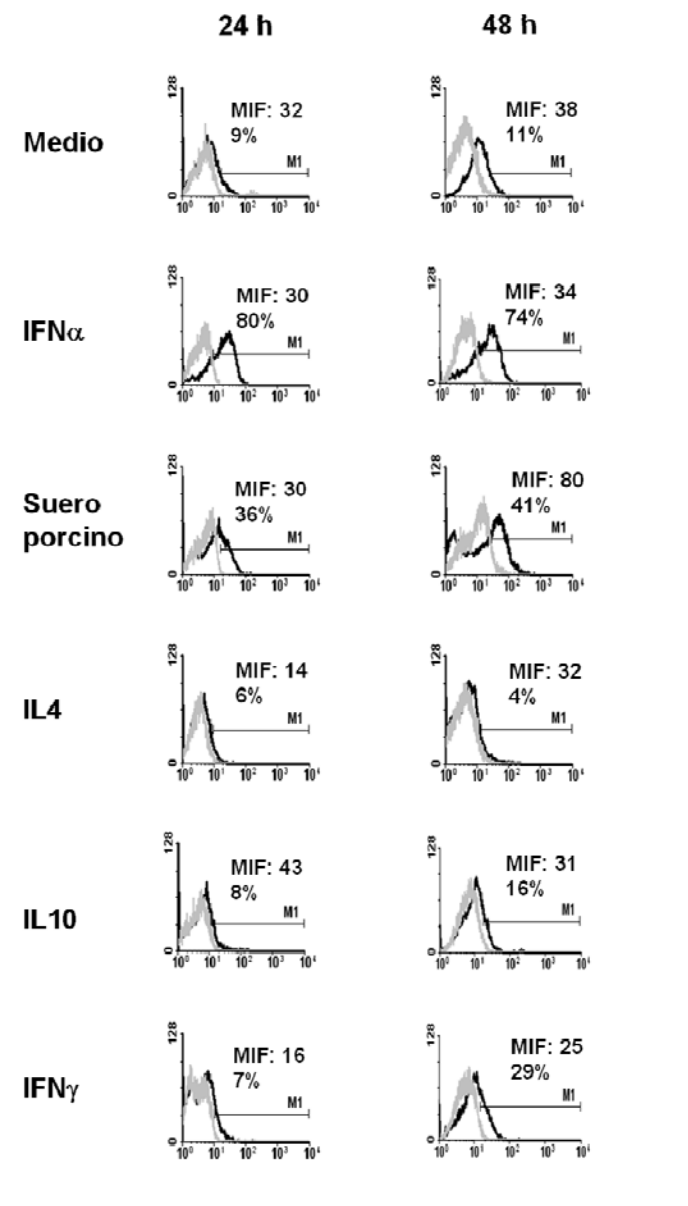


Figura 11. Regulación en monocitos de la expresión de la Sn por citoquinas o suero de cerdo. Los histogramas en negro muestran la tinción del AcMo 1F1 (anti-Sn) en monocitos incubados con los diferentes estímulos durante 24 ó 48 horas. Los histogramas grises corresponden al marcaje de un AcMo irrelevante del mismo isotipo. Estos AcMos se revelaron con un anticuerpo generado en conejo que reconoce Igs de ratón marcado con FITC. Los valores muestran el porcentaje de células positivas para este receptor y la media de intensidad de fluorescencia (MIF). Estos resultados son representativos de cinco experimentos independientes.

2. Distribución de los receptores Sn, CD163 y TLR2 en órganos linfoides secundarios.

A continuación se evaluó mediante inmunohistoquímica si la localización de las células Sn⁺ en órganos linfoides secundarios era la adecuada para llevar a cabo la captación antigénica. Además, realizando estudios de inmunofluorescencia, se analizó la co-expresión de los receptores Sn, CD163 y TLR2 con otros marcadores asociados a células con capacidad para presentar Ag de manera eficiente a los linfocitos.

2.1. Inmunohistoquímica.

La distribución del TLR2 y del CD163 porcinos en los órganos linfoides secundarios ya había sido descrita previamente. El TLR2 se expresa en células localizadas en áreas interfoliculares de las placas de Peyer y en los ganglios linfáticos, en los folículos linfoides y en los cordones medulares (Tohno et al., 2005). Las células CD163⁺ se han detectado en la pulpa roja en el bazo, en los macrófagos subcapsulares y medulares de los ganglios linfáticos y en las amígdalas (Bullido et al., 1997b; Van den Heuvel et al., 1999).

Con respecto a la Sn, en el bazo las células Sn⁺ aparecían localizadas principalmente en el límite entre la pulpa blanca y la pulpa roja, bordeando la zona marginal, y asociadas a las paredes de los vasos elipsoidales (ver figura 12 A). En los ganglios linfáticos las células Sn⁺ se detectaron en los senos subcapsular y medular y en la periferia de los folículos, observándose así mismo algunas células positivas en el interior de los mismos (ver Figura 12 B).

Por tanto, las células positivas para Sn, CD163 y TLR2 se localizan en zonas anatómicamente apropiadas para capturar Ags.

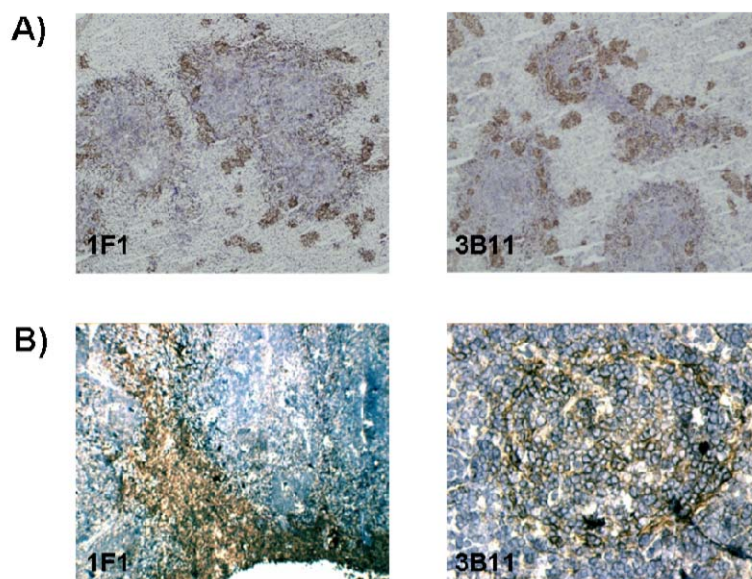


Figura 12. Localización de la Sn en cortes de bazo y ganglios linfáticos mediastínicos mediante inmunohistoquímica. Tinción de los AcMos 1F1 y 3B11 (AcMos anti-Sn) en el bazo (A) y en los ganglios linfáticos (B). Las fotografías se obtuvieron con una ampliación de 40X (A) y 100X (B).

2.2. Inmunofluorescencia.

Se realizó un estudio más detallado del fenotipo de las células CD163⁺ y Sn⁺ presentes en los órganos linfoides secundarios. Para ello se analizó la expresión de los marcadores CD172a, CD11R1 y SLAII en la superficie de estas células ya que dichos marcadores han sido asociados, en la especie porcina, a células capaces de actuar como APCs.

La expresión de TLR2 en bazo y ganglio linfático fue prácticamente indetectable, por lo que no se pudo realizar el estudio fenotípico de las células TLR2⁺ en estos órganos.

2.2.1. Ganglio linfático.

La mayoría de las células del SCS del ganglio linfático co-expresaban Sn y CD163 (figura 13 A y B) y se detectaron células Sn⁺ en la zona perifolicular y en el interior de los folículos linfoides (F) (figura 13 A). En el SCS, todas las células que expresaban CD163 eran también positivas para CD172a (figura 13 C) y una gran proporción de ellas expresaban SLA II

(figura 13 D). No se observaron células $CD163^+$ que co-expresaran el marcador $CD11R1$.

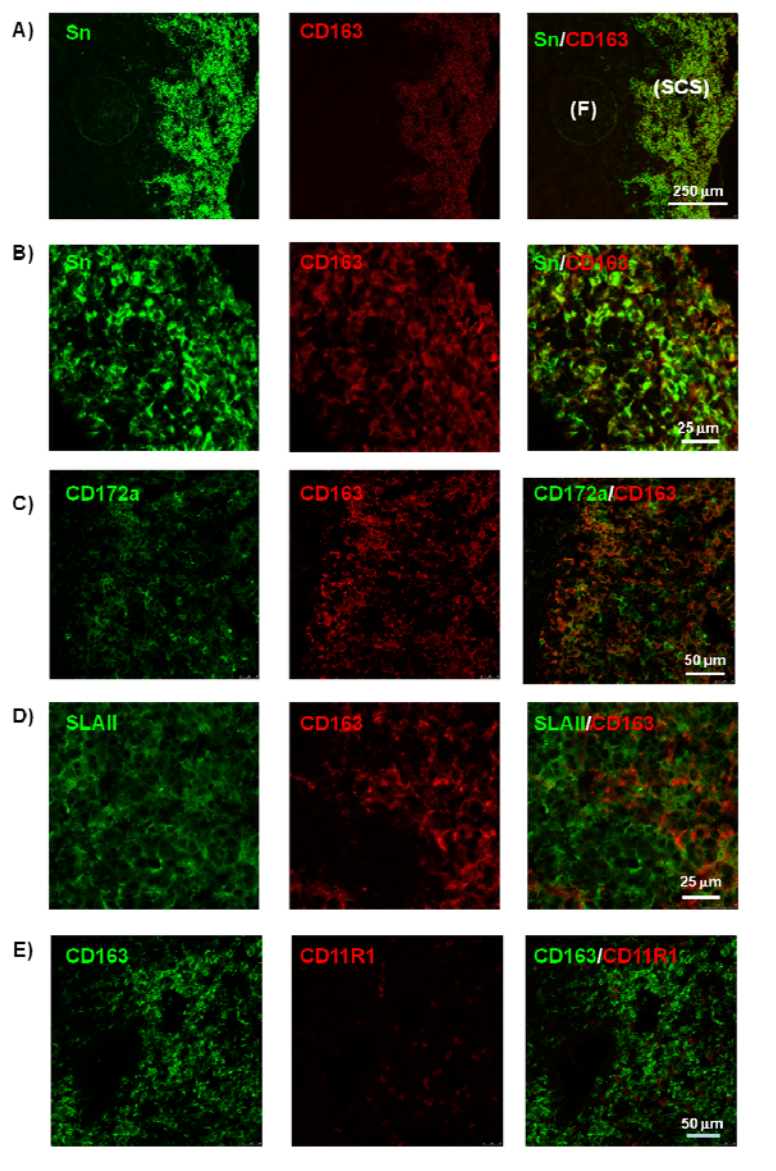


Figura 13. Análisis mediante inmunofluorescencia en cortes de ganglio linfático mediastínico del patrón de distribución de la Sn y del $CD163$ en el SCS (A y B) y el folículo (A) y de la co-expresión del receptor $CD163$ con las moléculas de $CD172a$ (C), SLA II (D) y $CD11R1$ (E) en células del SCS.

SCS (seno subcapsular) y F (folículo).

En cuanto a las células Sn^+ , tanto las que se encontraban en el SCS (figura 14 A y B) como en el folículo (figura 14 C, D y E), eran en su mayoría positivas para los marcadores $CD172a$ (figura 14 A y C) y SLA II (figura 14 B y D). Además, dentro de los folículos, se halló una pequeña

proporción de células Sn^+ que expresaban el marcador CD11R1 (figura 14 E).

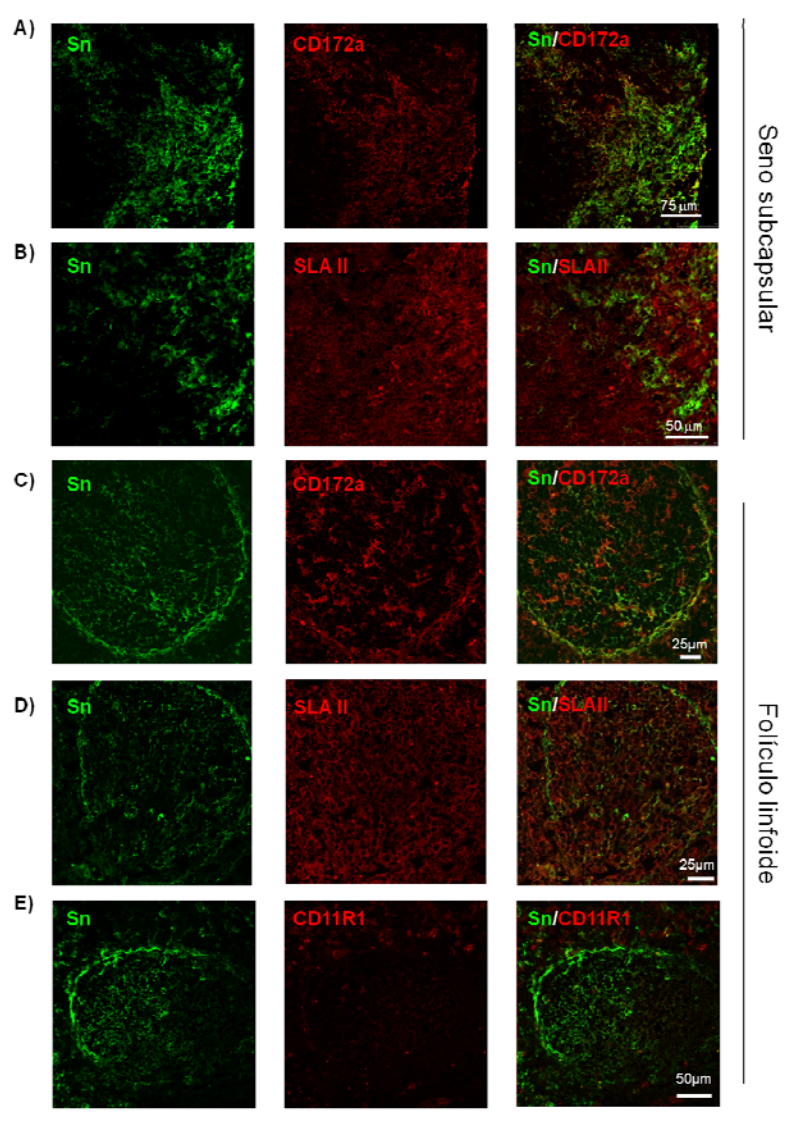


Figura 14. Análisis mediante inmunofluorescencia en cortes de ganglio linfático mediastínico de la expresión de las moléculas de CD172a (A y C), SLA II (B y D) y CD11R1 (E) en las células Sn^+ localizadas en el SCS y en los folículos.

2.2.2. Bazo.

En el bazo, como se ha señalado anteriormente, los receptores Sn y CD163 presentan un patrón de distribución diferente, detectándose las células Sn^+ a ambos lados de la zona marginal (ZM) y asociadas a las paredes de los vasos elipsoidales (E), mientras que las células CD163^+ se localizaban preferentemente en la pulpa roja (PR) (figura 15 A y B). Cuando se analizó la co-expresión de la Sn con otros marcadores asociados a

células con capacidad de presentar Ag, se observó que una alta proporción de las células Sn^+ expresaban las moléculas CD172a (figura 15 C) y SLAII (figura 15 D). Además, una pequeña proporción de estas células Sn^+ también fueron positivas para la molécula CD11R1 (figura 15 E).

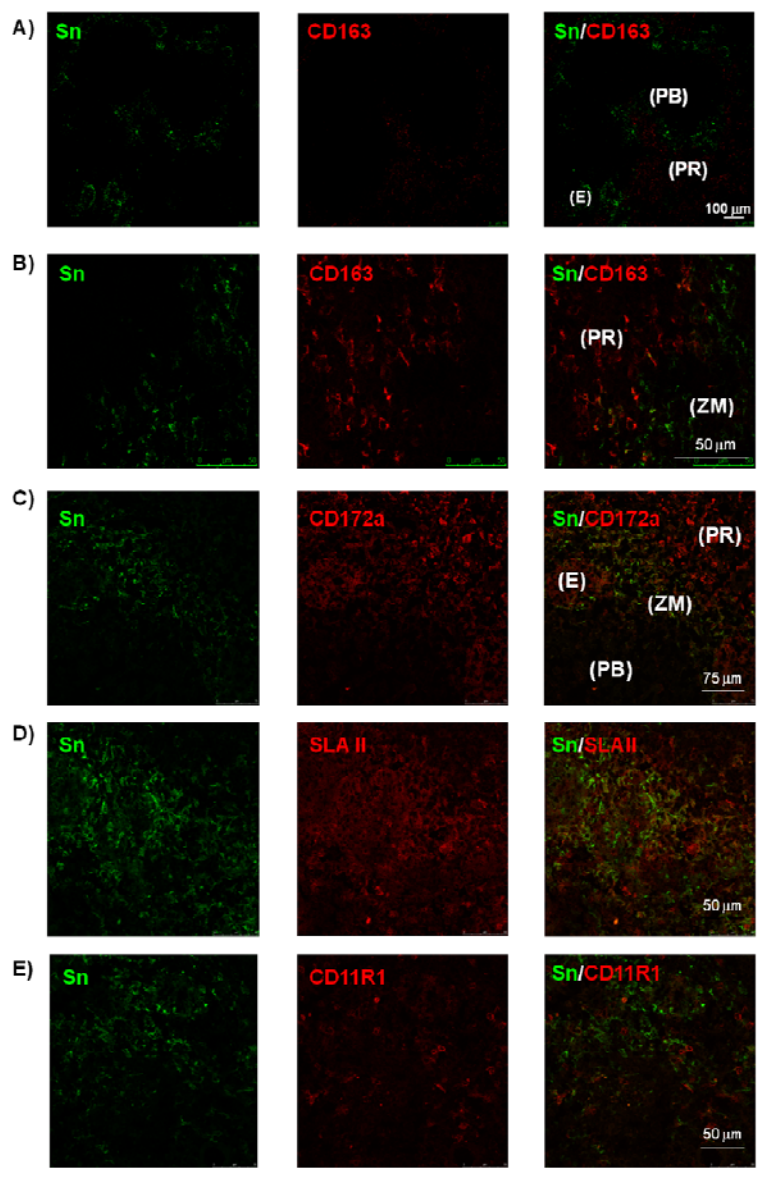


Figura 15. Análisis mediante inmunofluorescencia en cortes de bazo del patrón de distribución de la Sn y el CD163 (A y B), así como de la co-expresión en las células Sn^+ de las moléculas de CD172a (C), SLA II (D) y CD11R1 (E).

PB (pulpa blanca), PR (pulpa roja), E (elipsoides) y ZM (zona marginal).

En las células CD163^+ se observó que la mayoría expresaban el receptor mieloide CD172a (figura 16 A) así como también moléculas SLAII (figura 16

B). Sin embargo, no se detectó expresión de CD11R1 en estas células (figura 16 C).

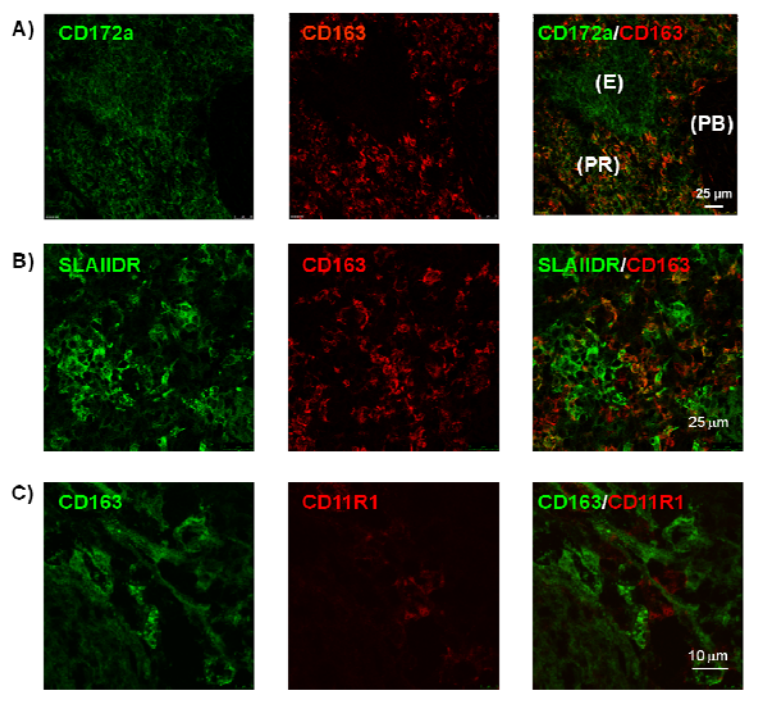


Figura 16. Análisis mediante inmunofluorescencia en cortes de bazo de la distribución del CD163 y su co-expresión con las moléculas de CD172a (A), SLA II (B) y CD11R1 (C).

PB (pulpa blanca), PR (pulpa roja) y E (elipsoides).

3. Estudio fenotípico de las poblaciones celulares Sn^+ y CD163^+ presentes en órganos linfoides secundarios mediante citometría de flujo.

En los datos descritos previamente se observa una alta heterogeneidad en las poblaciones de células Sn^+ y/o CD163^+ en el bazo y los ganglios linfáticos. Con el fin de profundizar más en el conocimiento del fenotipo de dichas poblaciones, se realizaron suspensiones celulares de estos tejidos y se analizó mediante citometría de flujo la co-expresión de Sn y/o CD163 con diferentes marcadores asociados a APCs. Estos marcadores fueron el CD172a, el CD11R3, el CD14, el SLA II, el CD11R1, el CD80/86 y el CD16.

3.1. Ganglio linfático.

La mayoría de las células (más del 60%) que expresaban Sn eran también CD163^+ . Todas las células Sn^+ CD163^+ eran positivas para el

receptor mieloide CD172a, así como también para las moléculas SLAII y CD80/86, mostrando en todos los casos altos niveles de intensidad de fluorescencia, lo que indican que son receptores muy representados en estas células. Además, cuando se estudiaron las moléculas CD11R1, CD11R3 y CD14, alrededor de un 40% la población $\text{Sn}^+ \text{CD163}^+$ expresaba estos marcadores, aunque con baja intensidad (ver figura 17).

En cuanto a las células simples positivas para Sn, prácticamente todas ellas expresaban los marcadores CD172a, SLAII y CD80/86. Además, cuando se comparó con la población $\text{Sn}^+ \text{CD163}^+$, se detectó un mayor porcentaje de células ($\geq 50\%$) que expresaban los receptores CD11R1 y CD11R3 y, en ambos casos, con una intensidad mayor. Por otro lado, sólo una pequeña proporción de las células Sn^+ expresaban también en su superficie CD14 (ver figura 17).

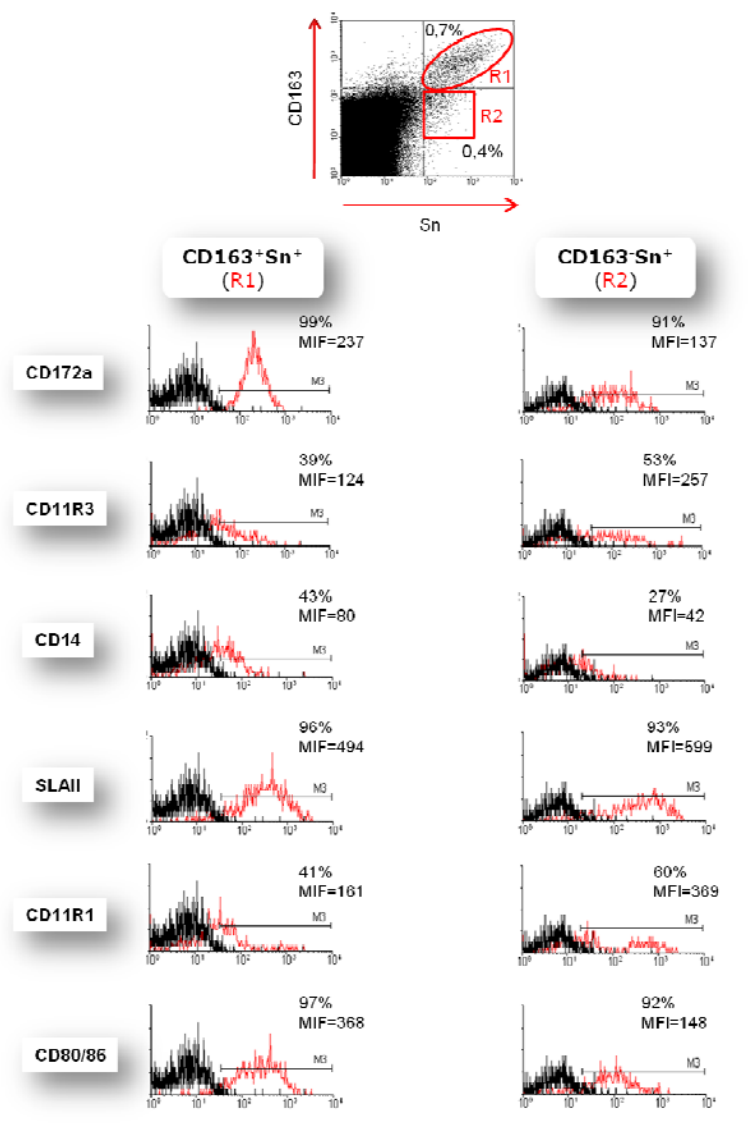


Figura 17. Estudio fenotípico de las células CD163⁺ y Sn⁺ en suspensiones celulares de ganglios linfáticos mediastínicos. En el *dot-plot* se muestra el porcentaje de células CD163⁺ Sn⁺ (región R1) y el de células CD163⁻ Sn⁺ (región R2). Los histogramas muestran los patrones de expresión de las moléculas CD172a, CD11R3, CD14, SLAII, CD11R1 y CD80/86 de las células que aparecen en cada una de estas regiones. Las células muertas fueron excluidas del análisis mediante su marcaje con yoduro de propidio. En los histogramas se representan el porcentaje de células positivas y la media de intensidad de fluorescencia (MFI). Se adquirieron 500.000 eventos totales. Estos datos son representativos de cinco experimentos independientes.

3.2. Bazo.

Como ya se había observado en las tinciones de tejido realizadas en este órgano mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, la Sn y el CD163 se expresaban en poblaciones celulares diferentes. La mayoría de las células CD163⁺ co-expresaban los marcadores CD172a, CD11R3 y CD16. Para estas tres moléculas, el perfil de citometría obtenido mostraba claramente una población positiva y medias de intensidad de fluorescencia (MIF) altas, por lo que estas células expresaban en su superficie gran cantidad de estos receptores. Además, una fracción importante de las mismas, aproximadamente un tercio, expresaban los marcadores SLAII y CD80/86 mientras que estas células eran prácticamente negativas para la expresión de CD11R1 y CD14 (ver figura 18).

En el caso de la población Sn⁺, el porcentaje de células que expresaban el marcador CD172a fue inferior al detectado en las células CD163⁺. Esta molécula, al igual que los receptores SLAII, CD11R1 y CD16, se expresaba en aproximadamente la mitad de las células Sn⁺. Cabe destacar que, en esta población, se detectó un mayor número de células SLAII⁺ y CD11R1⁺ y un nivel de expresión de estas moléculas mucho más alto que la población CD163⁺. Por otro lado, alrededor de un 30% de la población Sn⁺ expresaba los receptores CD11R3 y CD80/86, mientras que la mayoría de las células eran negativas para CD14 (ver figura 18). Además, aunque el número de células CD11R3⁺ era menor en esta población que en la CD163⁺, las células positivas para este marcador lo expresaban en niveles mucho más altos.

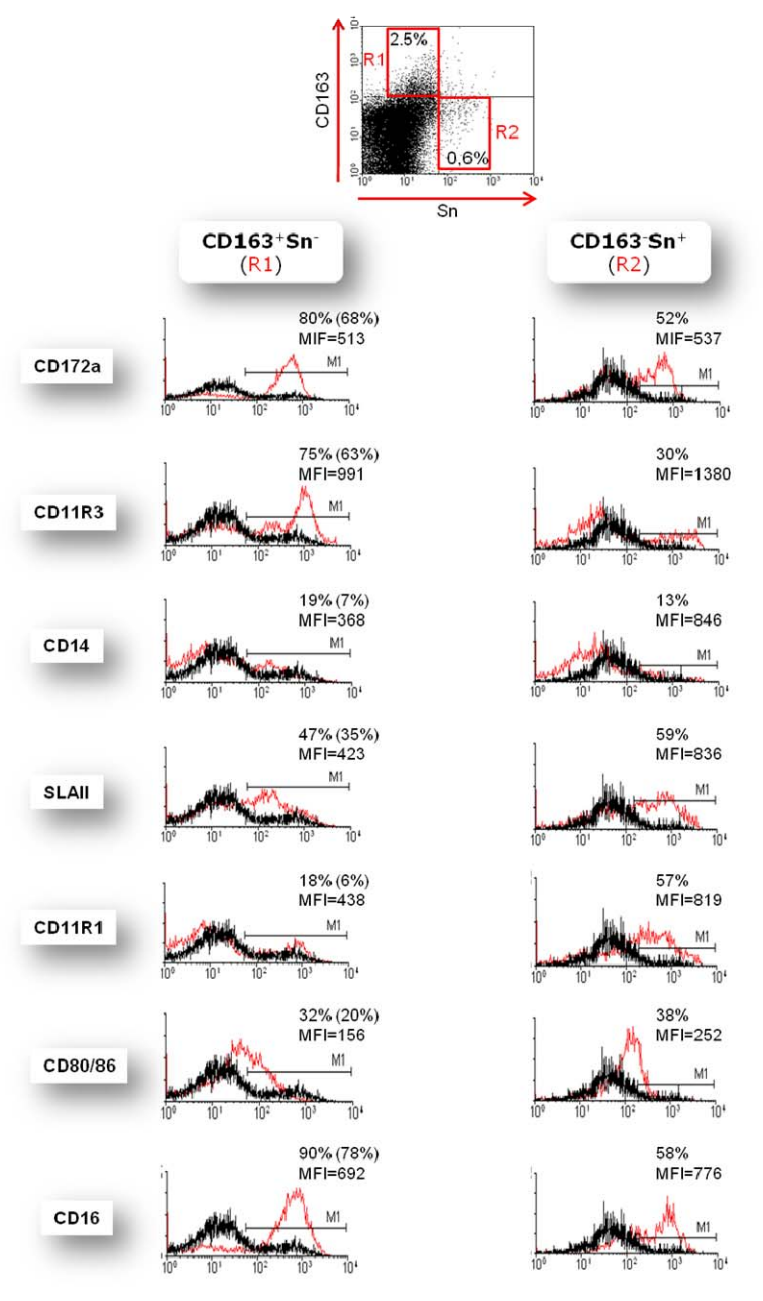


Figura 18. Estudio fenotípico de las células CD163⁺ y Sn⁺ en suspensiones celulares de bazo. La región R1 muestra el porcentaje celular de la población CD163⁺ y la región R2 el porcentaje de células Sn⁺. Los histogramas muestran los patrones de expresión de las moléculas CD172a, CD11R3, CD14, SLAI, CD11R1, CD80/86 y CD16 en las células que aparecen en cada una de estas regiones. Las células muertas fueron excluidas del análisis mediante ioduro de propidio. En los histogramas se representan el porcentaje de células positivas y la media de intensidad de fluorescencia (MFI). Se adquirieron 500.000 eventos totales. Estos datos son representativos de cuatro experimentos independientes.

4. Estudio de la capacidad de endocitosis de los receptores Sn, CD163 y TRL2.

Un criterio importante a seguir en la selección de receptores a los que dirigir Ag para mejorar su presentación es que éstos sean endocíticos. Por ello analizamos si los receptores Sn, CD163 y TLR2 eran capaces de internalizar los AcMos utilizados en nuestro estudio. Se incubaron macrófagos alveolares durante 15, 30 ó 45 minutos con los AcMos 1F1, 2A10 o 1H11, o con un AcMo irrelevante como control negativo, marcados con Alexa 488. Esta incubación se realizó a 37°C y sin azida para permitir la internalización de los receptores. A continuación, se trataron las células con un tampón de disociación de pH bajo para eliminar el AcMo unido en la superficie celular. Como controles se utilizaron células marcadas con los AcMos a 4°C y en presencia de azida, sin tratar con el tampón de disociación para observar el máximo marcaje en superficie, o tratadas con el tampón de bajo pH para comprobar la efectividad del mismo. Este abordaje experimental se esquematiza en la figura 19.

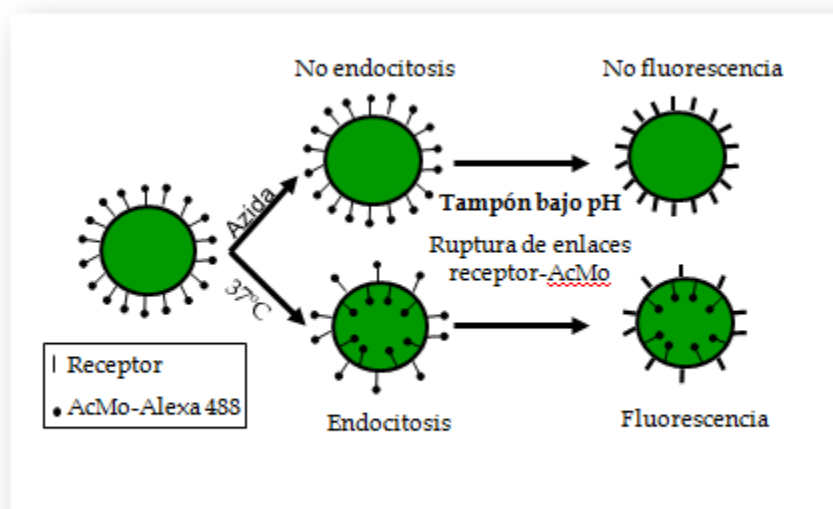


Figura 19. Esquema del protocolo experimental para llevar a cabo los estudios de endocitosis.

Como se muestra en la figura 20, el AcMo anti-Sn marcado con Alexa 488 se endocitó rápidamente. Así, después de 15 minutos de incubación a 37°C y tras tratar a las células con el tampón de pH bajo, aproximadamente el 30% de las células siguieron mostrando marcaje con Alexa 488. Este marcaje intracelular aumentó con el tiempo, detectándose progresivamente un mayor número de células que habían internalizado el AcMo. El mayor

índice de endocitosis se alcanzó a los 45 minutos ya que, tras 60 minutos de incubación, el porcentaje de células que habían endocitado el AcMo se mantuvo en los mismos valores (datos no mostrados).

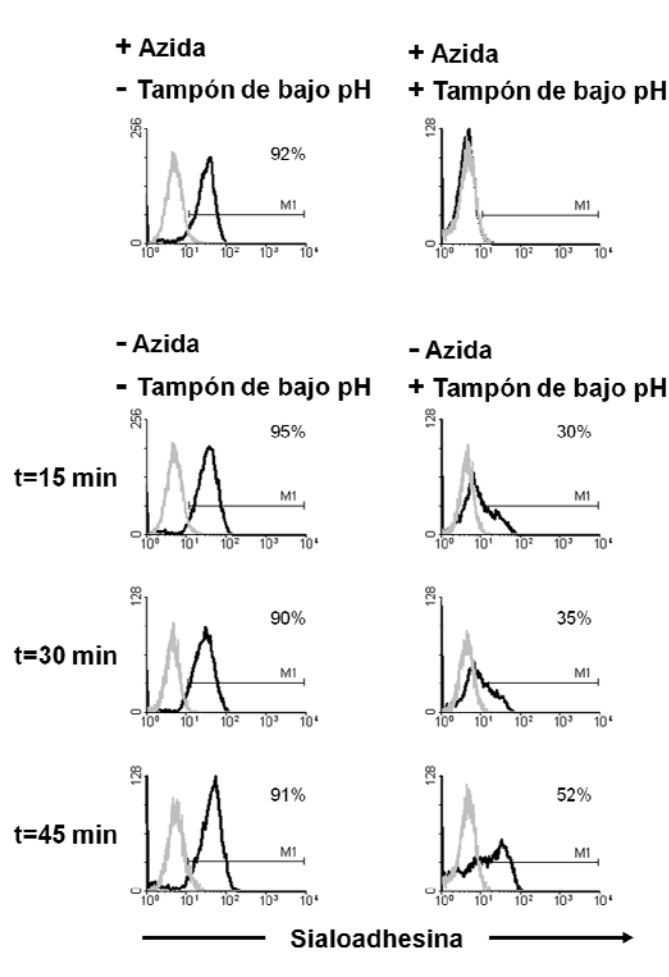


Figura 20. El AcMo 1F1 (anti-Sn) se endocita de manera muy eficaz en macrófagos alveolares. Los histogramas en negro muestran la fluorescencia del AcMo 1F1 Alexa 488 asociada a las células tras diferentes tiempos de incubación a 37°C y después de ser tratadas o no con el tampón de disociación. Como controles se utilizaron células marcadas con el AcMo 1F1 Alexa 488 a 4°C en presencia de azida, sin tratar (máximo marcaje en superficie) o tratadas (marcaje residual) con el tampón de bajo pH. Los histogramas en gris muestran el marcaje de un AcMo irrelevante del mismo isotipo. Estos resultados son representativos de tres experimentos independientes.

El AcMo anti-CD163 también fue internalizado de manera rápida y eficaz ya que, transcurridos tan sólo 15 minutos de incubación, casi un 80% de la

células presentaban fluorescencia en su interior. A tiempos posteriores, el porcentaje de células que habían endocitado el AcMo fue aumentando hasta llegar a aproximadamente a un 90% a los 45 minutos. (ver figura 21).

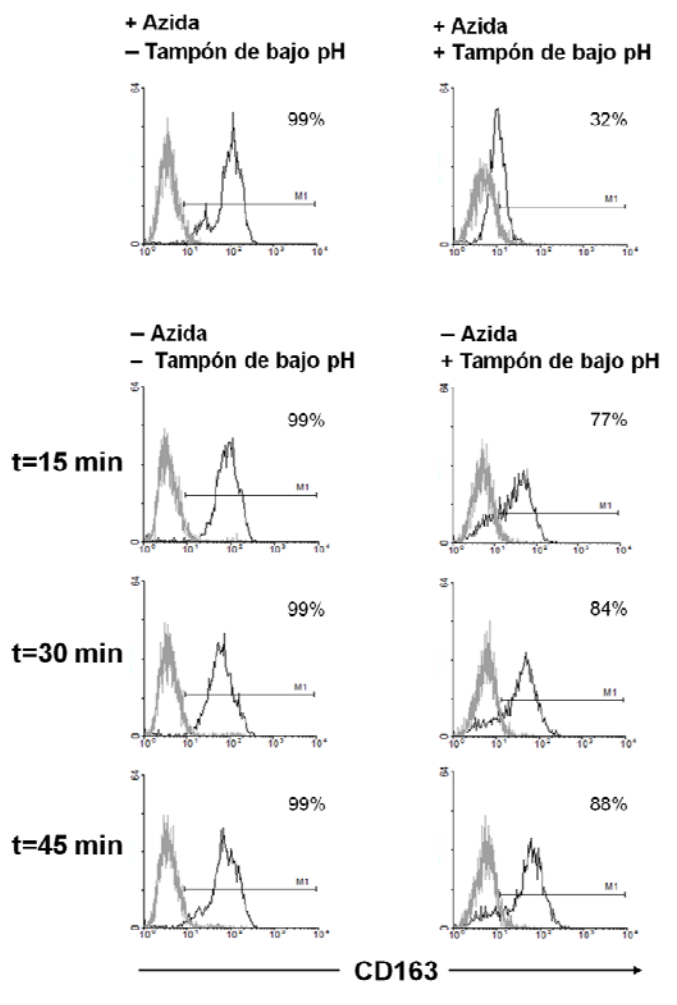


Figura 21. El AcMo 2A10 (anti-CD163) se endocita de manera muy rápida y eficaz en macrófagos alveolares. Los histogramas en negro muestran la fluorescencia del AcMo 2A10 Alexa 488 asociada a las células tras diferentes tiempos de incubación a 37°C y después de ser tratadas o no con el tampón de disociación. Como controles se utilizaron células marcadas con el AcMo 2A10 Alexa 488 a 4°C en presencia de azida, sin tratar (máximo marcaje en superficie) o tratadas (marcaje residual) con el tampón de bajo pH. Los histogramas en gris muestran el marcaje de un AcMo irrelevante del mismo isotipo. Estos resultados son representativos de dos experimentos independientes.

En consonancia con lo que se había observado en trabajos anteriores (Alvarez et al., 2008), cuando se analizó la expresión en macrófagos

alveolares del TLR2 en ausencia de azida y del tampón de pH bajo se observó una baja expresión de esta molécula en la población analizada. El estudio de la cinética de endocitosis del AcMo 1H11 mostró un aumento progresivo en el porcentaje de células que habían incorporado el AcMo a lo largo del tiempo. Así, a los 45 minutos de incubación, una proporción significativa de las células mostraba marcaje intracelular (ver figura 22).

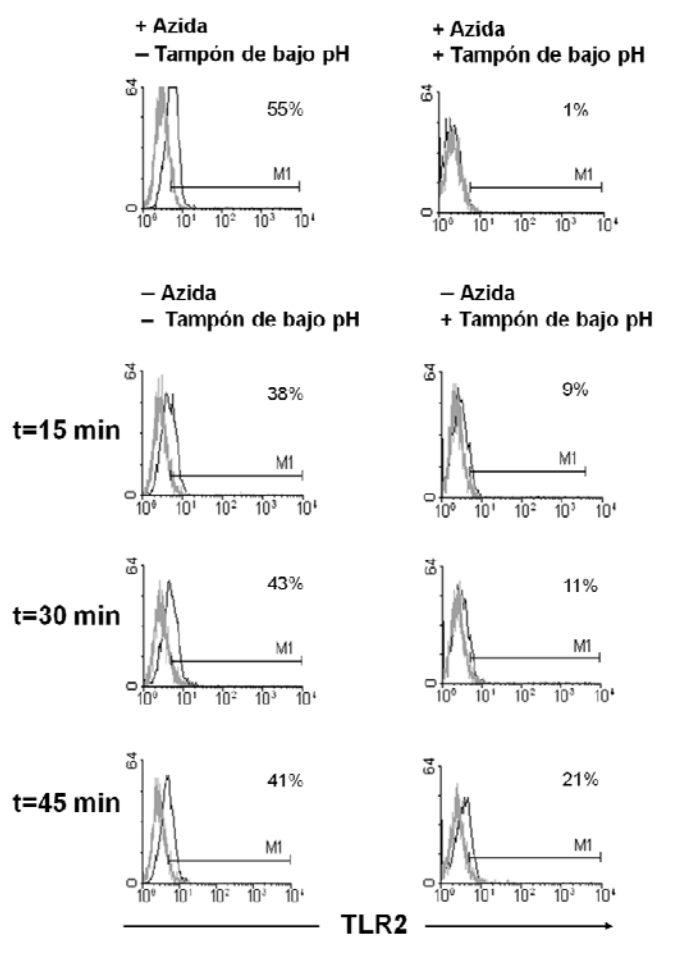


Figura 22. El AcMo 1H11 (anti-TLR2) se endocita de manera eficaz en macrófagos alveolares. Los histogramas negros muestran la fluorescencia del AcMo 1H11 Alexa 488 asociada a las células tras diferentes tiempos de incubación a 37°C y después de ser tratadas o no con el tampón de disociación. Como controles se utilizaron células marcadas con el AcMo 1H11 Alexa 488 a 4°C en presencia de azida, sin tratar (máximo marcaje en superficie) o tratadas (marcaje residual) con el tampón de bajo pH. Los histogramas grises muestran el marcaje de un AcMo irrelevante del mismo isotipo

Estos resultados indican que los AcMos frente a los receptores Sn, CD163 y TLR2 son endocitados de forma rápida y en cantidades significativas por los macrófagos alveolares.

5. Evaluación *in vitro* de la capacidad de los AcMos anti Sn, CD163 y TLR2 de dirigir Ag a las APCs.

Tras comprobar que la Sn, el CD163 y el TLR2 se expresan en APCs localizadas en zonas apropiadas para la captación de Ag y que son capaces de internalizar los AcMos específicos frente a ellos, se comprobó si cuando se dirigía el Ag a estos receptores se favorecía su presentación a los linfocitos T. Para ello se estableció un modelo experimental aprovechando que las Igs de ratón son inmunogénicas en el cerdo. Se inmunizaron cerdos con una mezcla de IgGs de ratón, y se utilizaron sus CMSP como células respondedoras. Esta estrategia nos permitió realizar el estudio de una manera mucho más sencilla ya que no fue necesario fusionar los AcMos a un Ag. Así se comparó la respuesta proliferativa generada por los AcMos 1F1, 3B11, 2A10, 2H12 y 1H11, que reconocen los receptores seleccionados (Sn, CD163 y TLR2) (ver tabla 1 en apartado 3 de material y métodos), con la obtenida con una IgG control del mismo isotipo (ver figura 23).

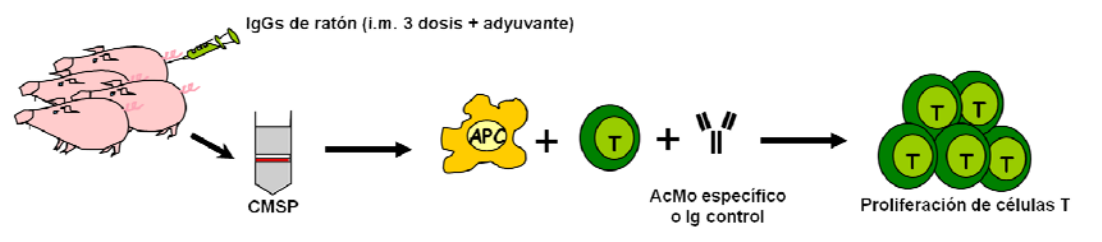


Figura 23. Esquema del modelo experimental de los estudios de direccionamiento de Ag *in vitro*.

Debido a que la Sn no se expresa en monocitos en condiciones basales, en el estudio de dicho receptor como diana para dirigir Ag, empleamos como APCs MoDCs y monocitos tratados con IFN α para inducir su expresión. Cuando se emplearon MoDCs como APCs, con tan solo 0,02 $\mu\text{g/ml}$ de AcMo 1F1 se obtuvo una respuesta proliferativa (10593 ± 731 cpms) equivalente a la desencadenada con 2 $\mu\text{g/ml}$ de la Ig control (7414 ± 681) (figura 24 A). Al realizar el mismo estudio utilizando como APCs monocitos cultivados con

IFN α , con 0,01 $\mu\text{g/ml}$ de cualquiera de los dos AcMos frente a Sn (3B11 ó 1F1), que reconocen diferentes epítomos de esta molécula, se obtuvieron niveles similares de linfoproliferación (7476 ± 518 cpms y 6937 ± 970 cpms respectivamente) que con 1 $\mu\text{g/ml}$ de la Ig control del mismo isotipo (6828 ± 207 cpms y 6969 ± 1334 cpms respectivamente) (ver figura 24 B y C). Por tanto, cuando se dirigía el Ag a la Sn se requería un cantidad 100 veces menor de AcMo anti-Sn que de la Ig control para obtener una respuesta de magnitud similar.

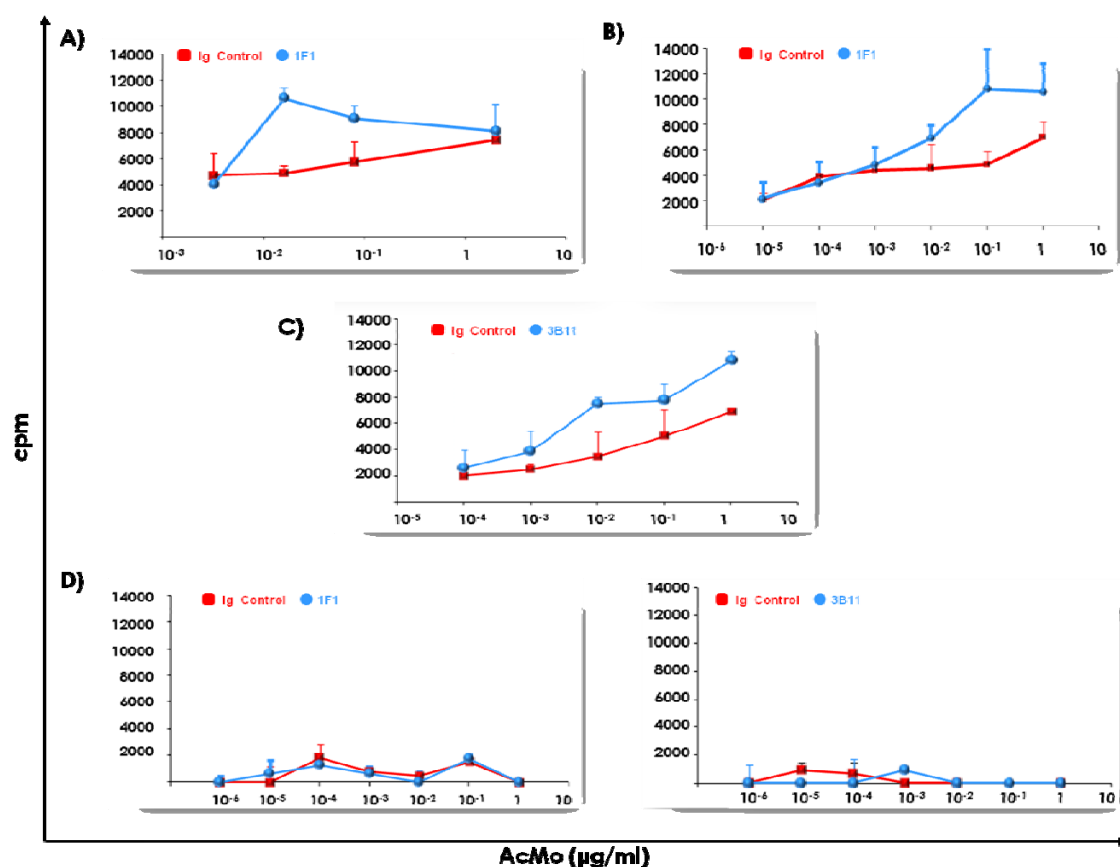


Figura 24. Dirigir el Ag a la molécula de Sn favorece la respuesta proliferativa específica *in vitro*. En las gráficas se representa la incorporación de ^3H timidina en las células T de cerdos inmunizados con una mezcla de Igs de ratón (A, B y C) o de cerdos no inmunizados (D), estimuladas con los AcMos 1F1 (A, B y D) (●), 3B11 (C y D) (●) e Ig control del mismo isotipo (■) a las concentraciones indicadas. El estudio se realizó con MoDCs (A) y con monocitos tratados con IFN α durante 24 horas (B, C y D). Estos resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

En el caso de los AcMos 2H12 y 2A10, los cuales reconocen diferentes epítomos de la molécula de CD163, se necesitaron 0,02 $\mu\text{g/ml}$ de 2A10 y 0,03 $\mu\text{g/ml}$ de 2H12 para conseguir los mismos niveles de proliferación ($6740,5 \pm 695$ y 6825 ± 458 cpms respectivamente) que con 1,6 $\mu\text{g/ml}$ de Ig control (7045 ± 374), es decir, 80 veces menos de AcMo 2A10 y 53 veces menos cantidad del AcMo 2H12 (ver figura 25 A).

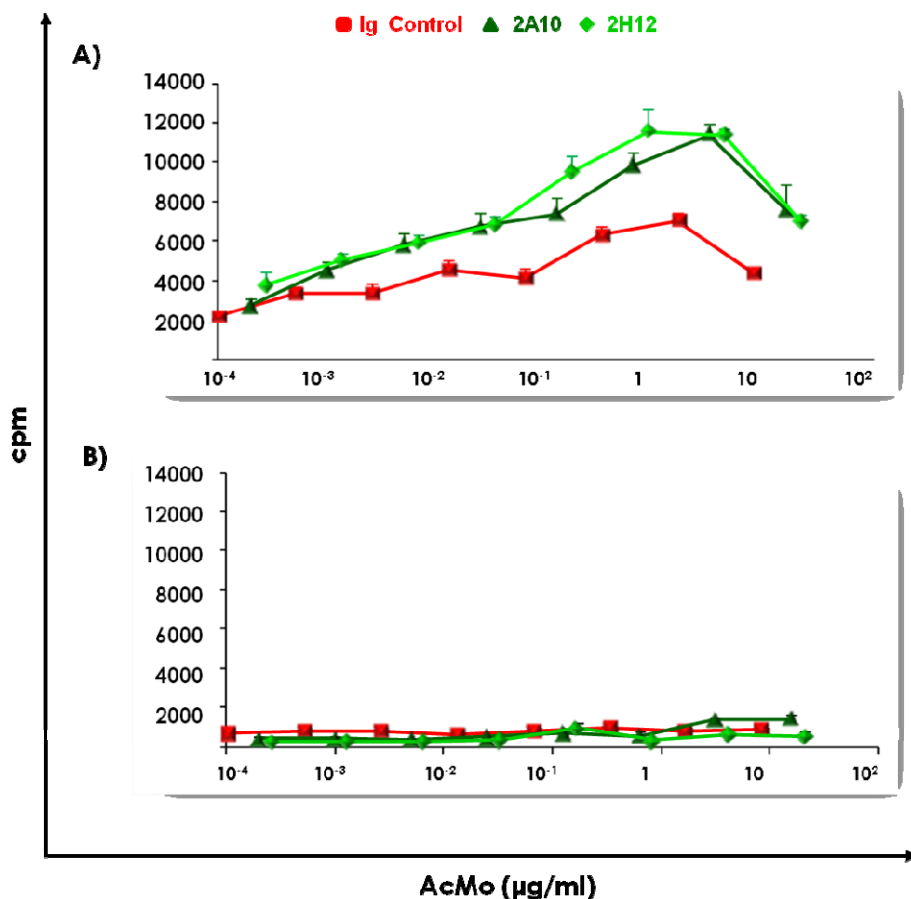


Figura 25. Dirigir el Ag al CD163 favorece, *in vitro*, la respuesta linfoproliferativa. Las gráficas representan la incorporación de ^3H timidina en CMSP de cerdos inmunizados con una mezcla de Igs de ratón (A) o de cerdos no inmunizados (B), estimuladas con los AcMos 2A10 (\blacktriangle), 2H12 (\blacklozenge) (A) o la Ig control del mismo isotipo (\blacksquare) a las concentraciones indicadas. Estos resultados son representativos de al menos cinco experimentos independientes.

Cuando se dirigió el Ag al receptor TLR2 también se mejoró la respuesta celular ya que, con 0,064 $\mu\text{g/ml}$ de 1H11 se observó una linfoproliferación similar (6932 ± 632 cpms) a la obtenida con 1,6 $\mu\text{g/ml}$ de la Ig control (7045 ± 374). Por tanto se necesitaba una cantidad 25 veces menor de Ag al dirigir éste al receptor TLR2 (ver figura 26 A).

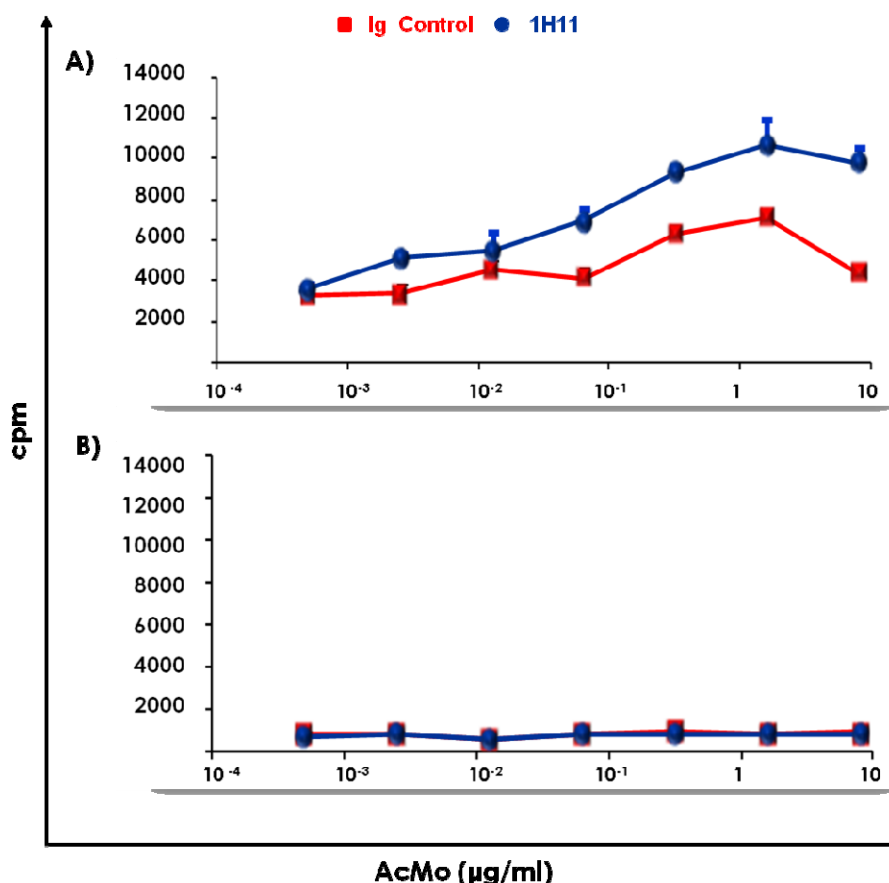


Figura 26. La respuesta proliferativa específica mejora cuando se dirige el Ag al receptor TLR2 *in vitro*. Las gráficas muestran la incorporación de ³H timidina en CMSP de cerdos inmunizados con una mezcla de Igs de ratón (A) o de cerdos no inmunizados (B), estimuladas con el AcMo 1H11 (●) o la Ig control del mismo isotipo (■) a las concentraciones indicadas. Estos resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

En todos los casos, cuando se realizó el estudio siguiendo el mismo protocolo en animales no inmunizados, no se produjo respuesta proliferativa, indicando que se trata de una respuesta específica frente a Igs de ratón (Figura 24 D, 25 B y 26 B). Por tanto, estos resultados indican que los tres receptores, Sn, CD163 y TLR2, tienen potencial para actuar como dianas a las que dirigir Ag con objeto de mejorar su captación y presentación vía MHC a los linfocitos T.

6. Evaluación *in vivo* del potencial de los AcMos Anti-Sn, Anti-CD163 y Anti-TLR2 para actuar como vectores para dirigir Ag.

En este apartado analizamos el potencial de los receptores Sn, CD163 y TLR2 para actuar como dianas a las que dirigir Ag *in vivo*. Para ello se inmunizaron por vía subcutánea y sin adyuvante grupos de 5-6 cerdos, con 1 mg de los anticuerpos seleccionados (1F1, 2A10, 2H12 o 1H11), o con Igs control del mismo isotipo, para posteriormente analizar la respuesta inmune humoral y celular generada frente a Igs de ratón. Todos los animales recibieron una segunda dosis a las 6 semanas siguiendo el mismo protocolo. Se recogieron muestras de suero a las 0, 2, 4, 6, 8, 11 (excepto en los grupos inmunizados con el AcMo 1F1 o la Ig control del mismo isotipo que se recogieron muestras a las 10 y 12 semanas) y 17 semanas. También se recogieron muestras de sangre periférica a las 6, 8 y 17 semanas, y de bazo en el momento del sacrificio de los animales, para los ensayos de linfoproliferación (ver figura 27).

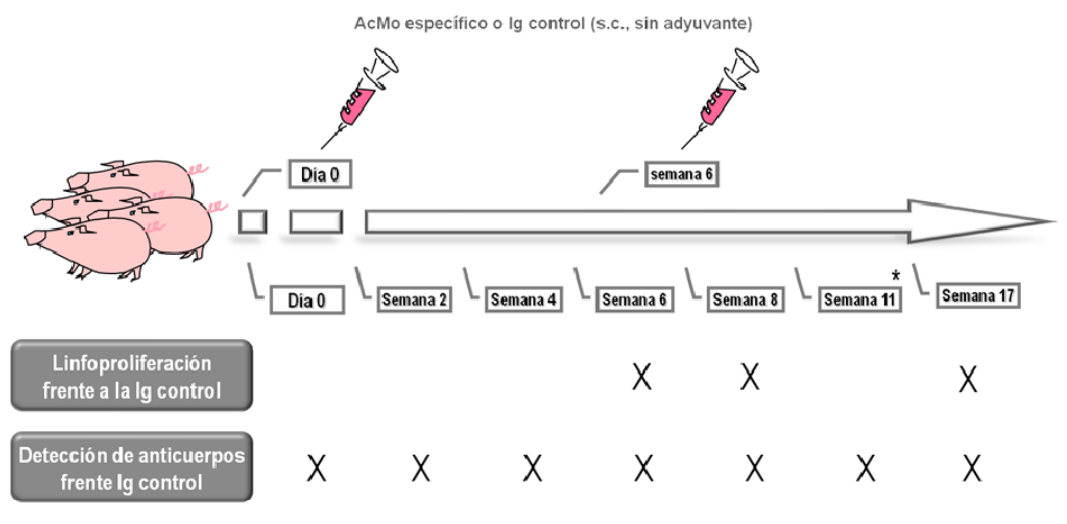


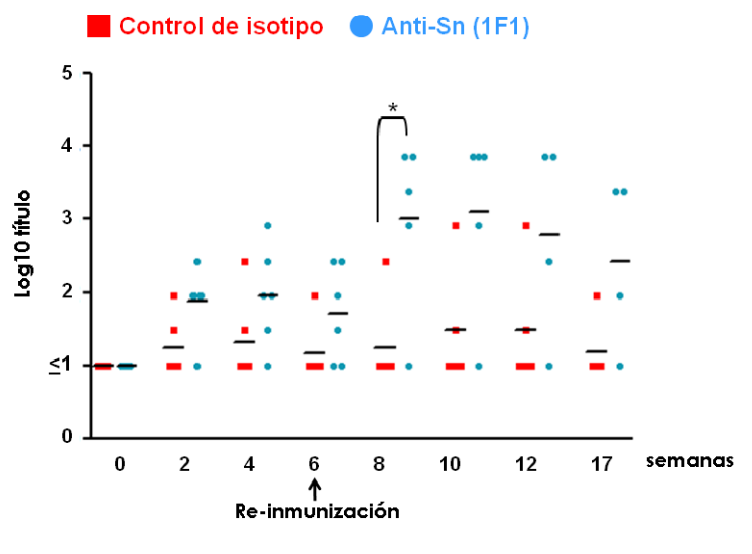
Figura 27. Esquema del modelo experimental de los ensayos para el estudio del efecto en la respuesta inmune de dirigir de Ag *in vivo* utilizando AcMos. (* en algunos grupos se obtuvo el suero a las semanas 10 y 12).

6.1. Respuesta humoral.

Se cuantificó la presencia de anticuerpos frente a Igs de ratón en los sueros de los animales inmunizados con los distintos AcMos mediante

ELISA. Para ello se utilizaron placas tapizadas con la Ig control del isotipo correspondiente en cada caso para favorecer la detección de la respuesta en los animales control. Los datos obtenidos se expresaron en títulos de anticuerpo, considerados como la máxima dilución a la cual un suero tiene una absorbancia 0,1 unidades de densidad óptica (D.O.) mayor a la del control negativo (tampón de ELISA).

Los sueros de los animales inmunizados con los AcMos específicos frente a los receptores CD163 (2A10 y 2H12) y Sn (1F1) presentaron unos niveles de IgGs específicas frente a IgGs de ratón significativamente más altos que el grupo control a lo largo de todo el ensayo, generando una respuesta inmune humoral específica fuerte y prolongada en el tiempo. En el caso de los sueros de los animales inmunizados con el AcMo anti-Sn, los títulos más altos se detectaron a la octava semana, dos semanas después de la segunda inmunización, donde los niveles medios de anticuerpos específicos frente IgG_{2a} de ratón fueron hasta 58 veces superiores a los del grupo control. Además, cabe destacar que en el grupo inmunizado con el AcMo anti-Sn aparecía un animal en el que no se detectó producción alguna de anticuerpos específicos a lo largo de todo el experimento. Si no se tiene en cuenta a este cerdo no respondedor, la producción de IgG totales específicas frente a Igs de ratón en la octava semana fue hasta 185 veces superior en este grupo a la detectada en el grupo inmunizado con la Ig control (figura 28). En la tabla 11 se muestra un resumen de los datos correspondientes a la producción de IgGs totales específicas frente a Igs de ratón en los sueros de los animales inmunizados con el AcMo anti-Sn con respecto al grupo control.

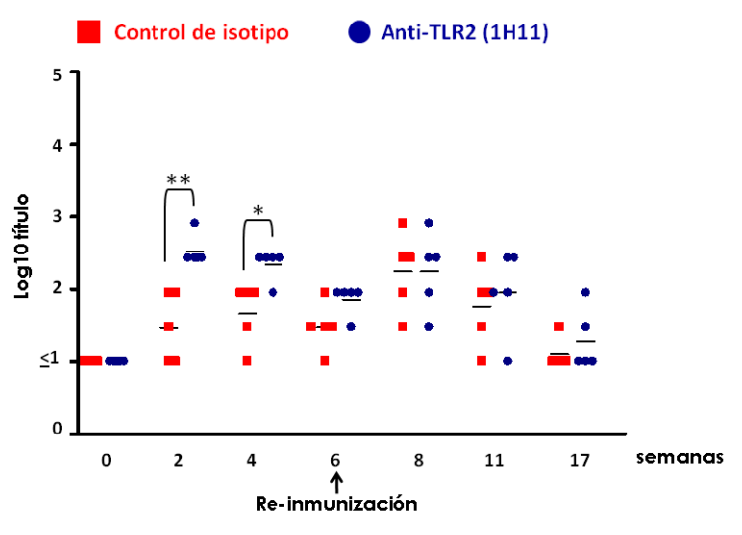


Grupo	Tiempo	Significación	Mejora
Sn	8 semanas	P=0,0303 *	58 veces
Sn (sin cerdo no respondedor)	2 semanas	P=0,0173 *	6 veces
	8 semanas	P=0,0095 **	185 veces
	10 semanas	P=0,0159 *	140 veces
	17 semanas	P=0,0357 *	52 veces

Figura 28 y tabla 11. Producción de anticuerpos específicos al dirigir Ag a la molécula de Sn. En la gráfica se representan los títulos de anticuerpos anti-IgGs de ratón determinados mediante ELISA presentes en los sueros de los animales inmunizados con los AcMos anti-Sn (●) o con la Ig control del mismo isotipo (■) en los diferentes tiempos del ensayo. Cada símbolo en la gráfica representa un animal del grupo correspondiente. El análisis estadístico se realizó utilizando el test Mann-Whitney (** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$). La tabla 11 muestra el resumen de los datos más relevantes del ensayo.

En la respuesta generada en los animales inmunizados con el AcMo anti-TLR2 (1H11) se detectó una producción de anticuerpos específicos significativamente superior durante las cuatro primeras semanas post-inmunización. En la segunda semana del ensayo, los niveles de anticuerpos específicos frente IgGs de ratón en los sueros de estos animales fueron

hasta 11 veces superiores a los detectados en los sueros procedentes del grupo control. Sin embargo, tras la segunda dosis de AcMo, la producción de anticuerpos específicos fue similar a la encontrada en los sueros de los animales inmunizados con la Ig control (figura 29 y tabla 12).

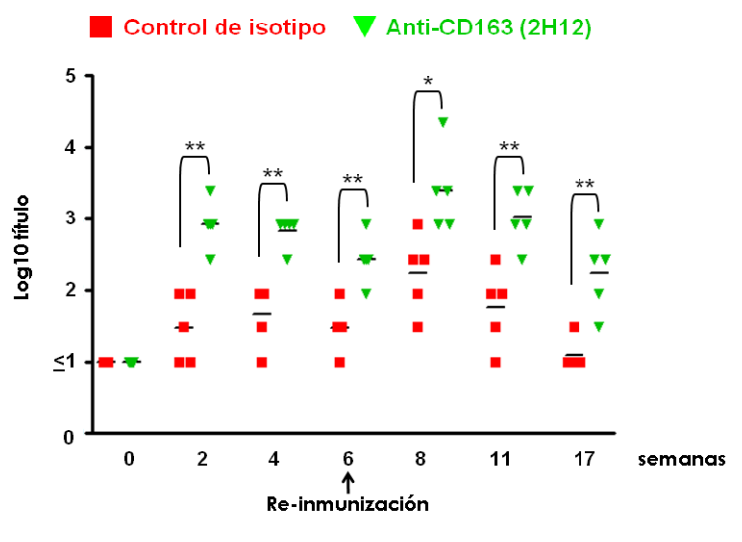


Grupo	Tiempo	Significación	Mejora
1H11	2 semanas	P=0,0079 **	11 veces
	4 semanas	P=0,0159 *	4 veces

Figura 29 y tabla 12. Producción de anticuerpos específicos al dirigir Ag a la molécula de TLR2. En la gráfica se representan, en los diferentes tiempos del ensayo, los títulos de anticuerpos anti-IgGs de ratón presentes en los sueros de los animales inmunizados con el AcMo anti-TLR2 (●) o con la Ig control del mismo isotipo (■). Estos títulos fueron determinados mediante ELISA. Cada símbolo en la gráfica representa un animal del grupo correspondiente. El análisis estadístico se realizó utilizando el test Mann-Whitney (** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$). La tabla 12 muestra el resumen de los datos más relevantes del ensayo.

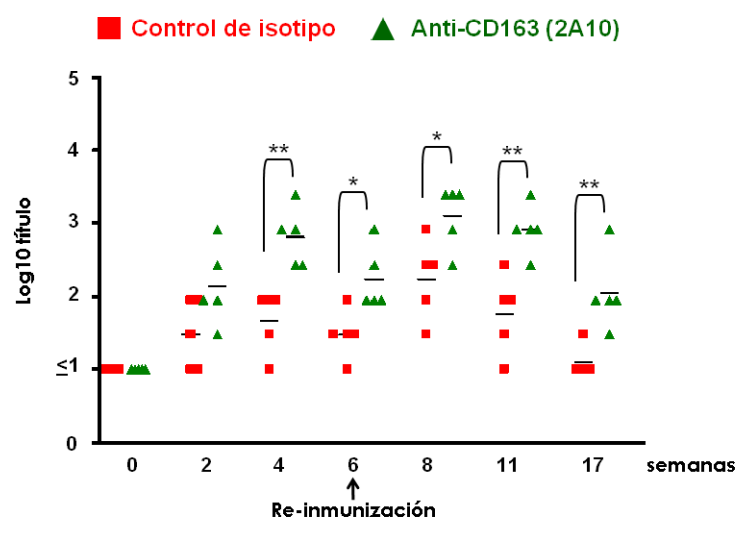
En los grupos inmunizados con los AcMos específicos frente a la molécula CD163 (2H12 o 2A10), la respuesta humoral se desencadenaba de manera temprana ya que, en la segunda y cuarta semana después de la primera inmunización respectivamente, los títulos de anticuerpos en los sueros de estos animales ya eran significativamente superiores a los encontrados en los sueros de los animales control. Ambos grupos

presentaban niveles séricos de IgGs anti-IgGs de ratón significativamente superiores al de los animales inmunizados con la Ig control prácticamente a lo largo de todo el ensayo, llegando a detectarse un incremento máximo en la cantidad de anticuerpos específicos de hasta 27 veces en los animales inmunizados con el AcMo 2H12 y de 14 veces en los animales inmunizados con el AcMo 2A10. La mejora en la respuesta humoral generada al dirigir el Ag a la molécula CD163 persistió hasta el final del ensayo, diecisiete semanas después de la primera inmunización. Además, no se observaron grandes diferencias entre la respuesta humoral inducida por cada uno de los dos AcMos frente a CD163 (2H12 y 2A10) (figuras 30 y 31 y tablas 13 y 14).



Grupo	Tiempo	Significación	Mejora
2H12	2 semanas	P=0,0079 **	27 veces
	4 semanas	P=0,0079 **	14 veces
	6 semanas	P=0,0079 **	9 veces
	8 semanas	P=0,0159 *	14 veces
	11 semanas	P=0,0079 **	17 veces
	17 semanas	P=0,0079 **	14 veces

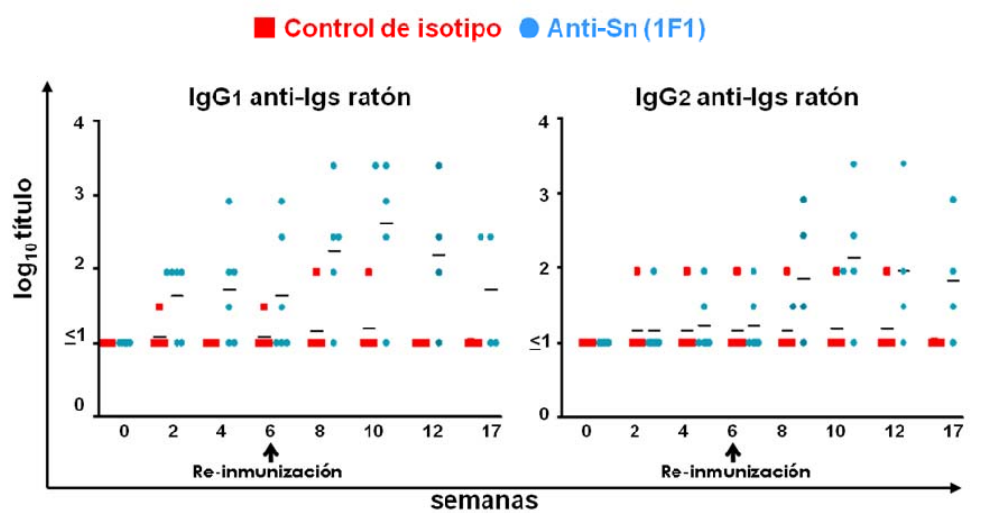
Figura 30 y tabla 13. Producción de anticuerpos específicos al dirigir Ag a la molécula CD163 utilizando el AcMo 2H12. La gráfica muestra los títulos de anticuerpos anti-IgGs de ratón, en los diferentes tiempos del ensayo, presentes en los sueros de los animales inmunizados con el AcMo anti-CD163 2H12 (▼) o con la Ig control del mismo isotipo (■). Los títulos fueron determinados mediante ELISA. Cada símbolo en la gráfica representa un animal del grupo correspondiente. El análisis estadístico se realizó utilizando el test Mann-Whitney (**p≤0,01; *p≤0,05). La tabla 13 muestra el resumen de los datos más relevantes del ensayo.



Grupo	Tiempo	Significación	Mejora
2A10	4 semanas	P=0,0079 **	14 veces
	6 semanas	P=0,0159 *	6 veces
	8 semanas	P=0,0317 *	7 veces
	11 semanas	P=0,0079 **	14 veces
	17 semanas	P=0,0079 **	9 veces

Figura 31 y tabla 14. Producción de anticuerpos específicos al dirigir Ag a la molécula CD163 utilizando el AcMo 2A10. En la gráfica se representan los títulos de anticuerpos anti-IgGs de ratón, determinados mediante ELISA, presentes en los sueros de los animales inmunizados con el AcMo anti-CD163 2A10 (▲) o con la Ig control del mismo isotipo (■). Cada símbolo en la gráfica representa un animal del grupo correspondiente en los diferentes tiempos en los que se realizó el ensayo. El análisis estadístico se realizó utilizando el test Mann-Whitney (** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$). La tabla 14 muestra el resumen de los datos más relevantes del ensayo.

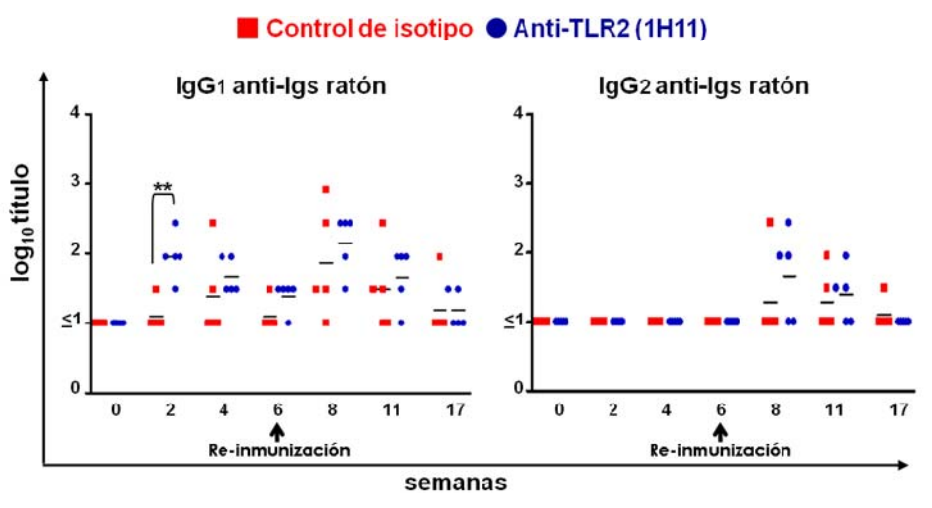
Para realizar una caracterización más detallada de la respuesta humoral, se estudió cuáles eran los isotipos predominantes de los anticuerpos que se inducían en cada grupo de animales. Los anticuerpos específicos frente a Igs de ratón que existían en los sueros de los animales inmunizados con el AcMo anti-Sn eran mayoritariamente de isotipo IgG₁ (figura 32) detectándose, dos semanas después de la re-inmunización, hasta 27 veces más anticuerpos de este isotipo en el suero de estos animales que en el de los inmunizados con la Ig control, aunque no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos. Sin embargo, cuando se compararon los niveles séricos medios entre este grupo y el grupo inmunizado con la Ig control sin considerar al animal no respondedor, la mejoría observada en la décima semana de ensayo fue de hasta 69 veces. En la misma semana, también se detectó una producción de anticuerpos específicos de isotipo IgG₂ 9 veces superior a la encontrada en los sueros del grupo control y de hasta 17 veces sin tener en cuenta al animal no respondedor. En la tabla 15 se resumen los datos correspondientes a la producción de los isotipos IgG₁ e IgG₂ específicos frente a Igs de ratón en los sueros de los animales inmunizados con el AcMo anti-Sn con respecto al grupo control.



Grupo	Tiempo	Significación	Mejora
Sn IgG₁	10 semanas	No hay diferencias significativas	27 veces
Sn IgG₁ (sin cerdo no respondedor)	2 semanas	P=0,0303 *	5 veces
	4 semanas	P=0,0303 *	7 veces
	8 semanas	P=0,0095 **	25 veces
	10 semanas	P=0,0159 *	69 veces
	12 semanas	P= 0,0357 *	39 veces
Sn IgG₂	10 semanas	No hay diferencias significativas	9 veces
Sn IgG₂ (sin cerdo no respondedor)	8 semanas	P=0,0381 *	8 veces
	10 semanas	P=0,0317 *	17 veces
	17 semanas	P= 0,0357 *	13 veces

Figura 32 tabla 15. Perfil de isotipos de IgGs detectados en el suero de los animales inmunizados con el AcMo anti-Sn. En la gráfica se representan los títulos de anticuerpos específicos de isotipo IgG₁ e IgG₂, determinados mediante ELISA, presentes en los sueros de los animales inmunizados con el AcMo anti-Sn (●) o con la Ig control del mismo isotipo (■). Los sueros fueron recolectados a los tiempos señalados. Cada símbolo en la gráfica representa un animal. El análisis estadístico se realizó utilizando el test Mann-Whitney (**p≤0,01; *p≤0,05). La tabla 15 muestra el resumen de los datos más relevantes del ensayo.

En los sueros de los animales inmunizados con el AcMo anti-TLR2, los anticuerpos que se produjeron fueron principalmente de isotipo IgG₁ y sólo se observaron diferencias significativas con respecto al grupo control dos semanas después de la primera inmunización (figura 33 y tabla 16).

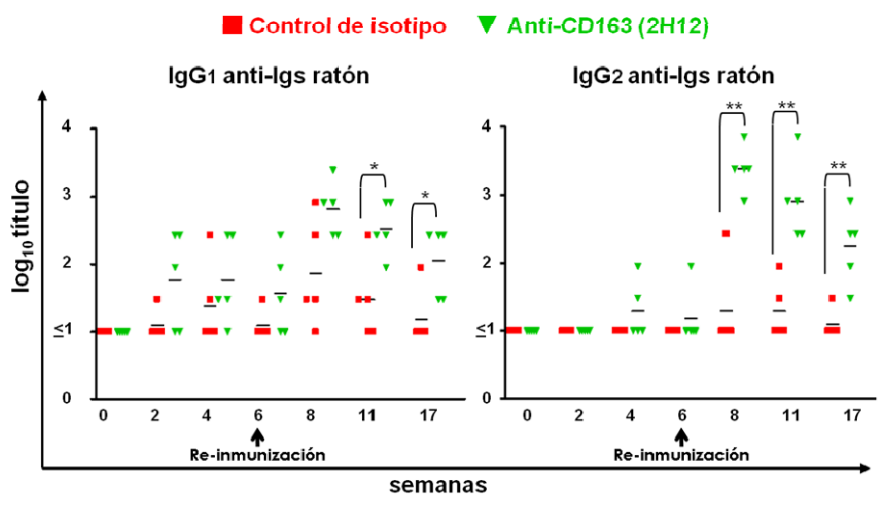


Grupo	Tiempo	Significación	Mejora
1H11 IgG ¹	2 semanas	P=0,0079 **	7 veces

Figura 33 y tabla 16. Perfil de isotipos de IgGs detectados en el suero de los animales inmunizados con el AcMo anti-TLR2. En la gráfica se representan los títulos de anticuerpos específicos de isotipo IgG₁ e IgG₂, a los tiempos señalados, presentes en los sueros de los animales inmunizados con el AcMo anti-TLR2 (●) o con la Ig control del mismo isotipo (■). Los títulos se determinaron mediante ELISA. Cada símbolo en la gráfica representa un animal. El análisis estadístico se realizó utilizando el test Mann-Whitney (**p≤0,01). La tabla 16 muestra el dato más relevante del ensayo.

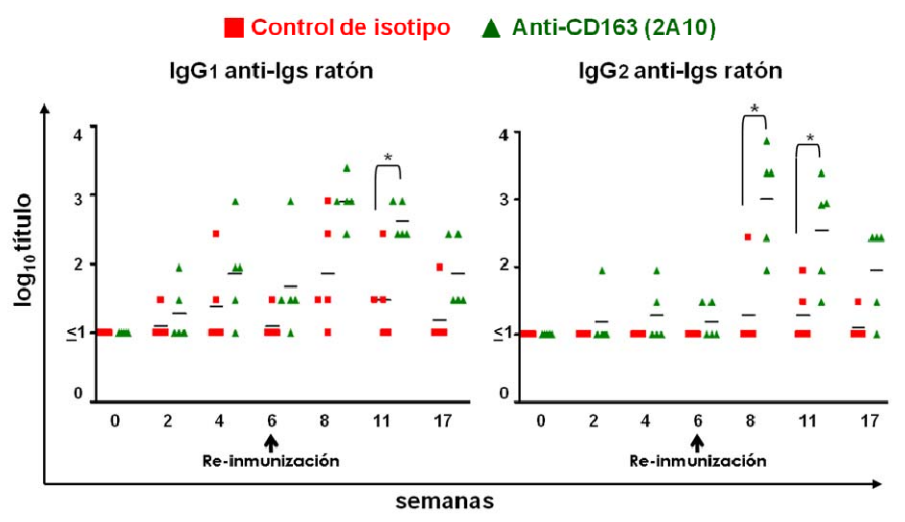
Por otro lado, en los dos grupos de animales inmunizados con los AcMos anti-CD163 2H12 y 2A10 se indujeron altos niveles de anticuerpos de isotipo IgG₂, particularmente dos semanas después de la segunda inmunización, donde fueron 126 y 52 veces superiores respectivamente a los detectados en los animales inmunizados con la Ig control. Además, en estos animales también se detectaron, en la undécima semana del ensayo,

aproximadamente 10 veces más anticuerpos específicos frente Igs de ratón de isotipo IgG₁ que en el grupo control (figuras 34 y 35 y tablas 17 y 18).



Grupo	Tiempo	Significación	Mejora
2H12 IgG₁	11 semanas	P=0,0317 *	11 veces
	17 semanas	P=0,0317 *	7 veces
2H12 IgG₂	8 semanas	P=0,0079 **	126 veces
	11 semanas	P=0,0079 **	42 veces
	17 semanas	P=0,0079 **	14 veces

Figura 34 y tabla 17. Perfil de isotipos de IgGs detectados en el suero de los animales inmunizados con el AcMo 2H12 (anti-CD163). En la gráfica se representan los títulos de anticuerpos específicos de isotipo IgG₁ e IgG₂ presentes en los sueros de los animales inmunizados con el AcMo 2H12 (▼) o con la Ig control del mismo isotipo (■), a los tiempos señalados. Los títulos se determinaron mediante ELISA. Cada símbolo en la gráfica representa un animal. El análisis estadístico se realizó utilizando el test Mann-Whitney (** p≤0,01; *p≤0,05). La tabla 17 muestra los datos más relevantes del ensayo.



Grupo	Tiempo	Significación	Mejora
2A10 IgG₁	11 semanas	P=0,0159 *	14 veces
2A10 IgG₂	8 semanas	P=0,0159 *	52 veces
	11 semanas	P=0,0317 *	18 veces

Figura 35 y tabla 18. Perfil de isotipos de IgGs detectados en el suero de los animales inmunizados con el AcMo 2A10 (anti-CD163). En la gráfica se representan los títulos de anticuerpos específicos de isotipo IgG₁ e IgG₂, determinados mediante ELISA, presentes en los sueros de los animales inmunizados con el AcMo 2A10 (▲) o con la Ig control del mismo isotipo (■). Los sueros fueron recolectados a los tiempos señalados. Cada símbolo en la gráfica representa un animal. El análisis estadístico se realizó utilizando el test Mann-Whitney (* $p \leq 0,05$). La tabla 18 muestra los datos más relevantes del ensayo.

Cuando se analizaron los títulos de IgA e IgM (figura 36) en los sueros de los animales inmunizados con cada uno de los AcMos seleccionados, los niveles detectados fueron muy bajos y no se encontraron diferencias significativas con los sueros de los animales control.

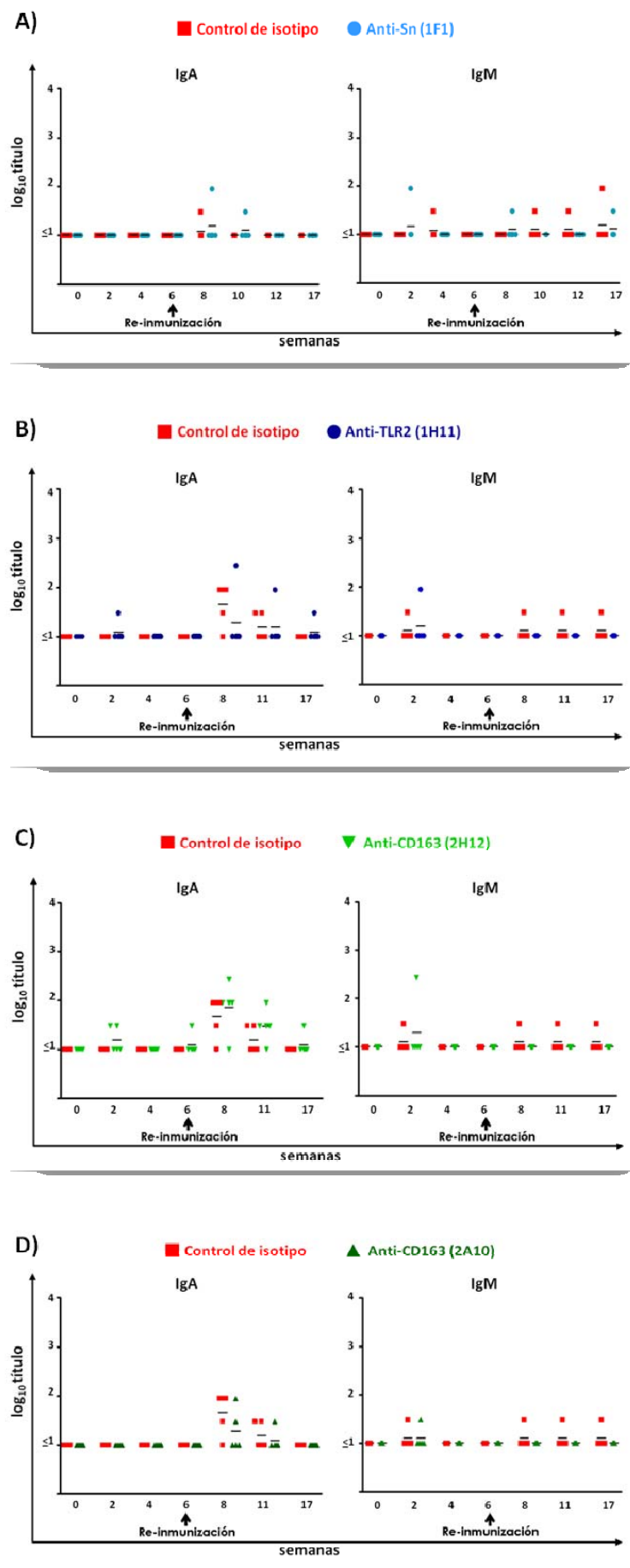


Figura 36. La producción de los isotipos IgA e IgM tras inmunizar con los distintos AcMos fue muy baja. Los anticuerpos de isotipo IgA e IgM anti-Igs de ratón presentes en los sueros de los animales inmunizados con los AcMo anti-Sn (A), TLR2 (B) y CD163 (C y D) se cuantificaron mediante ELISA. Cada símbolo en la gráfica (● AcMo anti-Sn; ● AcMo anti TLR2; ▼ AcMo anti-CD163 2H12; ▲ AcMo anti-CD163 2A10; ■ control) representa un animal del

6.2. Respuesta linfoproliferativa Ag-específica.

Para estudiar si la inmunización de los animales con los AcMos frente a Sn, CD163 y TLR2 mejora la respuesta celular, se analizó la respuesta proliferativa Ag-específica frente a la Ig control de las CMSP procedentes de los diferentes grupos de animales a las 6, 8 y 17 semanas y de los esplenocitos en el momento del sacrificio (semana 17).

Sólo en los animales inmunizados con el AcMo anti-Sn se observó una proliferación de células T significativamente superior a la detectada en el grupo control. En la sexta semana, tras una dosis de anticuerpo, se detectó proliferación Ag-específica en las CMSP de dos animales de este grupo. Dos semanas después de la segunda inmunización, las CMSP de todos los animales inmunizados con el AcMo anti-Sn proliferaron específicamente frente Igs de ratón, siendo la respuesta celular de este grupo (Media Δ cpms \pm sd= 2421 \pm 308,5) significativamente superior ($P=0,0079$) a la detectada en el grupo control (Media Δ cpms \pm sd = 271,4 \pm 225,7). En los animales inmunizados con la Ig control, tanto en la sexta como en la octava semana, sólo se observó proliferación en las CMSP de un animal (figura 37 A). En la semana 17, mientras que en ninguno de los animales del grupo control se detectó respuesta celular, en el grupo inmunizado con el AcMo anti-Sn, las CMSP de uno de estos animales seguían mostrando respuesta proliferativa específica frente Igs de ratón.

En los grupos de cerdos inmunizados con el AcMo anti-TLR2 o con los AcMos anti-CD163 no se observaron diferencias significativas en la respuesta celular con respecto al grupo control a ninguno de los tiempos estudiados. En los animales inmunizados con el AcMo anti-TLR2 no se observó proliferación Ag-específica en ningún animal a lo largo de todo el ensayo (Figura 37 B). Sin embargo, en los grupos inmunizados con los AcMos anti-CD163, seis semanas después de la primera inmunización se detectó en las CMSP de 3 animales inmunizados con 2H12 y de 2 animales inmunizados con 2A10 una respuesta proliferativa frente Igs de ratón superior a la de los animales del grupo control (Figura 37 C). Dos semanas después de la segunda inmunización se observó una leve respuesta proliferativa en dos animales inmunizados con el AcMo 2A10 y en un animal inmunizado con la Ig control. Además, en la semana 17 de ensayo, mientras que en ningún animal del grupo control se detectó respuesta celular, dos animales inmunizados con 2H12 y uno inmunizado con 2A10

presentaron Δ cpms superiores a 1000, valor a partir del cual consideramos la linfoproliferación detectada como positiva.

Por otro lado, cuando se analizó la respuesta proliferativa frente a las Igs de ratón de los esplenocitos procedentes de los animales de los diferentes grupos, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los casos respecto a los animales del grupo control (datos no mostrados).

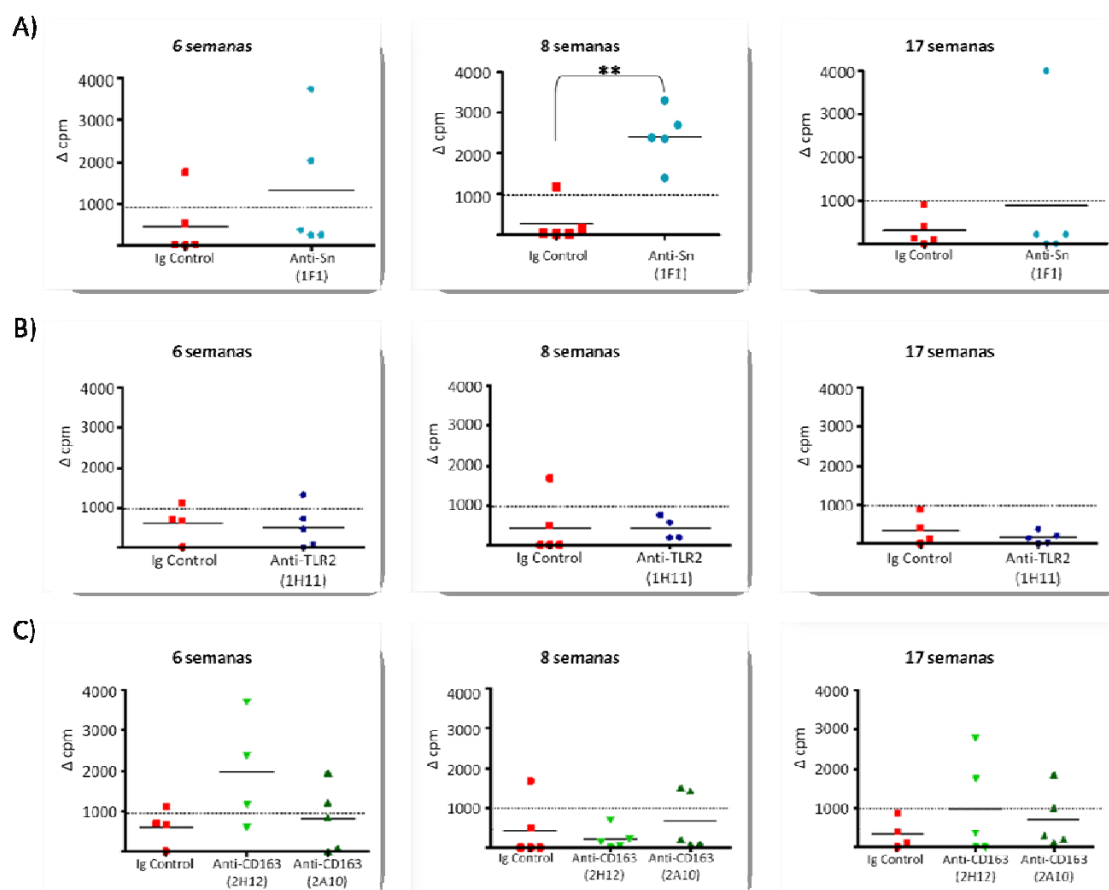


Figura 37. Proliferación Ag-específica de las CMSP de los animales inmunizados con los AcMos anti-Sn (A), anti-TLR2 (B), anti-CD163 (C) o con la Ig control del mismo isotipo. Cada símbolo en las gráficas (● AcMo anti-Sn; ● AcMo anti-TLR2; ▼ AcMo anti-CD163 2H12; ▲ AcMo anti-CD163 2A10; ■ Ig control) representa la diferencia entre la proliferación obtenida con 10 μ g/ml de Igs de ratón y la obtenida sólo con el medio de cultivo (Δ cpm) en cada uno de los animales. Se consideraron positivos los valores de Δ cpm superiores a 1000. El análisis estadístico se realizó utilizando el test Mann-Whitney (** $p \leq 0,01$).

MOLÉCULAS scFv COMO VECTORES VACUNALES EN UN MODELO DE INMUNIZACIÓN CON DNA

En la primera parte de esta tesis hemos demostrado que dirigir Ag a los receptores Sn y CD163 mejora la respuesta inmune, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ello decidimos generar las moléculas scFv de los AcMos 3B11 (anti-Sn) y 2A10 (anti-CD163), así como también del AcMo 1D9 como control negativo, con objeto de emplearlos como vectores vacunales. Estas proteínas tienen un tamaño pequeño y no contienen la región Fc por lo que deberían ser poco inmunogénicas y penetrar con mayor eficacia en los tejidos. En una primera fase, evaluamos su funcionalidad y especificidad así como la capacidad de sus receptores específicos para endocitarlas. Para realizar con mayor facilidad estos estudios los scFv de los AcMos se fusionaron a la GFP. A continuación los scFv se fusionaron a la Proteína N del virus del SRRP, la cual se empleó como Ag modelo, y los plásmidos que contenían los cDNA de las diferentes construcciones se emplearon en un modelo de inmunización con DNA.

7. Obtención de las proteínas recombinantes scFv anti-Sn y scFv anti-CD163 fusionadas a GFP.

7.1. Generación de las construcciones génicas scFv unidas a gfp.

Mediante PCR a partir del RNA de los hibridomas productores de los AcMos 3B11 (anti-Sn), 2A10 (anti-CD163) y 1D9 (control negativo), se amplificaron por separado las secuencias que codifican los dominios variables de la cadena pesada y ligera (V_H y V_L) de dichos AcMos. Para ello se utilizaron en el extremo 5' oligonucleótidos diseñados para hibridar con las secuencias líder de los segmentos variables de las Igs murinas y en el extremo 3' cebadores que hibridan al inicio de las secuencias que codifican los dominios constantes de la cadena pesada (C_{H1}) o de la cadena ligera (C_L) (ver figura 38).

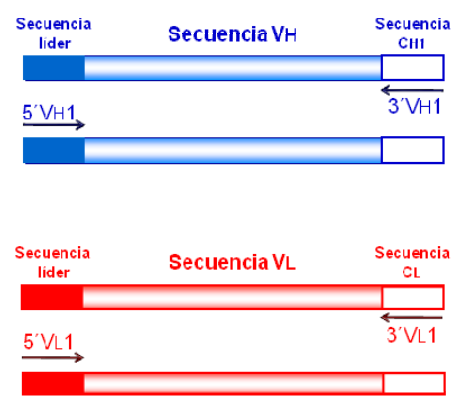


Figura 38. Representación de la hibridación de oligonucleótidos con las cadenas de cDNA desnaturalizadas que codifican los segmentos V_H y V_L .

Posteriormente ambos fragmentos se unieron entre sí mediante un oligonucleótido que codifica un péptido flexible, obteniéndose un cDNA de alrededor de 800 nts. Como se muestra en apartado 10.1.4 de material y métodos, esto se llevó a cabo mediante sucesivas PCRs, para las cuales fue necesario diseñar nuevos oligonucleótidos que no amplificasen las secuencia que codificaban para los dominios constantes C_{H1} y C_L ni el péptido señal de la cadena ligera, y que además contuvieran un segmento adicional con la secuencia que codifica el péptido de unión (Gly₄Ser)₃. El diseño de estos cebadores fue el siguiente:

* **5'V_H2:** Consta de los primeros 35-45 nts de la secuencia de la cadena pesada de cada uno de los AcMos incluyendo, por tanto, la secuencia que codifica el péptido señal.

* **3'V_H2:** Los oligonucleótidos 3'V_H2 tienen una longitud total de 52-54 nts, de los cuales, los primeros 19-21 contienen la secuencia complementaria a la del extremo 3' del segmento V, de tal forma que en la amplificación se excluye la secuencia del extremo del segmento C_{H1}. Los 33 nts restantes contienen la secuencia complementaria de la que codifica la parte N-terminal del péptido de unión, siendo los últimos 21 nts complementarios de los 21 nts del extremo 5' de los oligonucleótidos 5'V_L2.

* **5'V_L2:** Los primeros 33 nts codifican los últimos aminoácidos del péptido señal, no siendo homólogos a la secuencia codificante del dominio V_L del AcMo. De estos nts, los 21 primeros son complementarios al final de la secuencia que codifica el péptido de unión que se ha añadido en la V_H y los últimos 12 nts codifican los últimos 4 aminoácidos del péptido de unión. Los últimos 17-18 nts del cebador aparean con la secuencia de la V_L del AcMo a partir del nucleótido 80 para que, de esta manera, no aparezca en la construcción del scFv la secuencia que codifica el péptido señal ni el codon de iniciación.

* **3'V_L2:** Los oligonucleótidos 3'V_L2 constan de 28-29 nts y contienen la secuencia complementaria a la que codifica el extremo 3' del segmento V_L de cada uno de los AcMos, con lo que en la amplificación se elimina de la construcción la parte que codifica el extremo del dominio C_L.

En la figura 39 se muestra un esquema que resume los pasos que se realizaron para generar las secuencias que codifican un scFv.

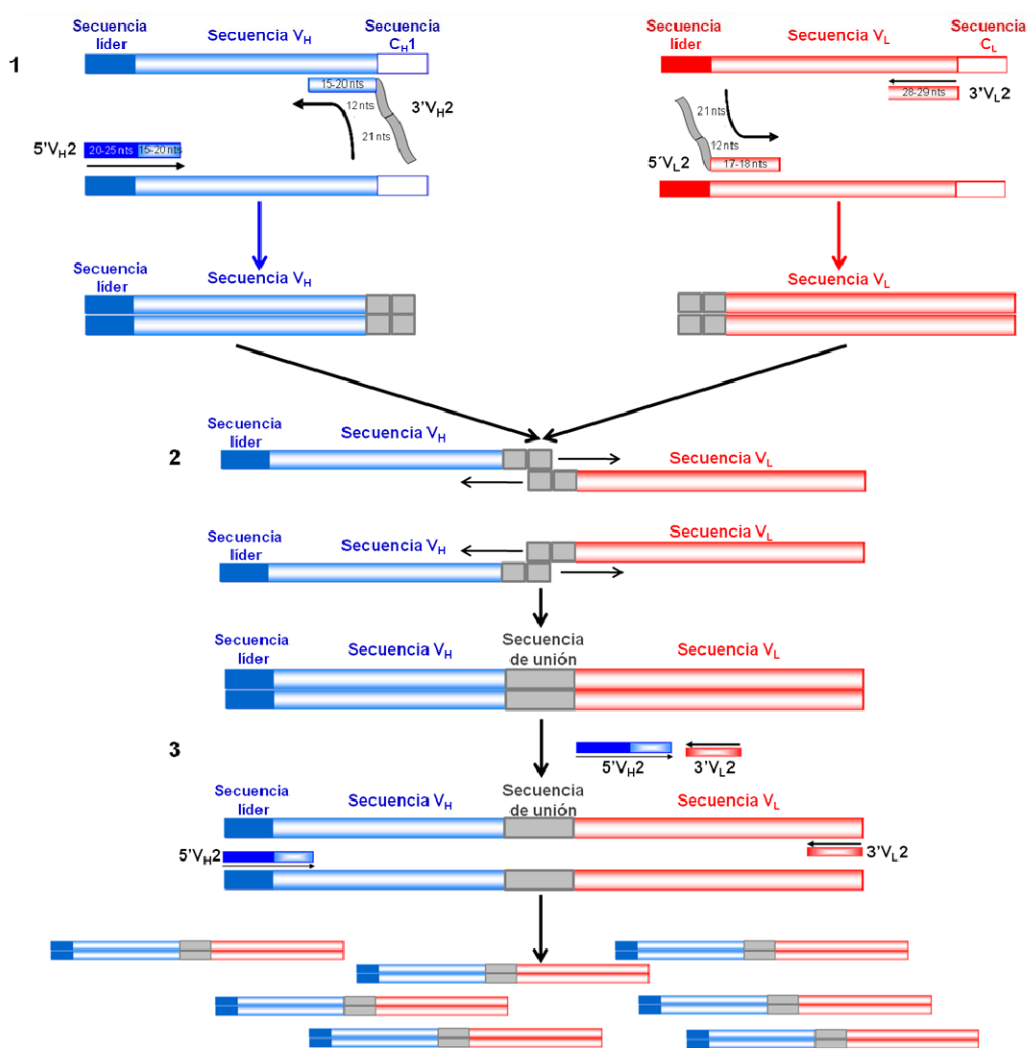


Figura 39. Esquema del ensamblaje de las secuencias que codifican los dominios V_H y V_L de un AcMo mediante una secuencia de unión para obtener la secuencia scFv y su posterior amplificación. 1. Eliminación de las secuencias que codifican las regiones constantes de cada una de las cadenas y de la secuencia líder de la cadena ligera. Incorporación de las secuencias que codifican el péptido de unión (33 nts al final de la secuencia que codifica la V_H y 33 nts al principio de la secuencia que codifica la V_L, de los cuales los 21 nts finales de la secuencia que codifica la V_H son complementarios a los 21 nts iniciales que se incluyen en la secuencia que codifica la V_L). **2.** Ensamblaje de los segmentos que codifican las cadenas V_H y V_L a través de la secuencia complementaria y elongación de la secuencia scFv en ausencia de cebadores. **3.** Adición de los oligonucleótidos 5'V_H y 3'V_L para amplificar la secuencia del scFv.

Los fragmentos obtenidos en las diferentes PCRs se analizaron en geles de agarosa (ver figura 40).

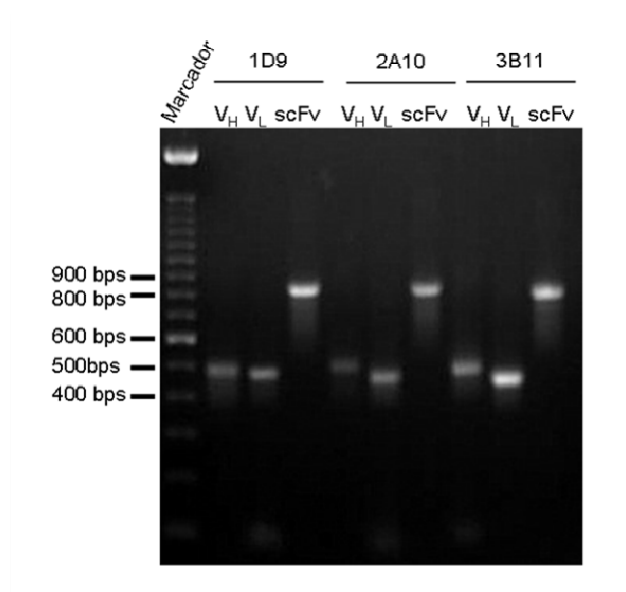


Figura 40. Gel de agarosa al 1,5% en el que se muestran los fragmentos de PCR de los cDNAs que codifican los dominios V_H y V_L y las construcciones scFv de cada uno de los AcMos. La PCRs se realizaron utilizando la pareja de nucleótidos específica correspondiente a cada secuencia (ver tabla 2 y 4 de material y métodos).

Estos fragmentos de PCR se clonaron en el plásmido pcDNA3.1/V5-His TOPO y se secuenciaron para comprobar sus tamaños y la fidelidad de la secuencia. Los tamaños de cada uno de los fragmentos de DNA obtenidos se especifican en la tabla 19, mientras que las secuencias se muestran en las figuras 41, 42 y 23.

Segmento	1D9	2A10	3B11
V_H	481 nts	487 nts	484 nts
V_L	474 nts	460 nts	451 nts
scFv	821 nts	813 nts	800 nts

Tabla 19. Tamaño de los fragmentos de cDNA que codifican los scFv correspondientes a los distintos AcMos y de los fragmentos empleados en su construcción.



Figura 41. Secuencias de los cDNAs que codifican los dominios V_H y V_L del AcMo 1D9 (control negativo) así como el scFv resultante. En verde se muestra la secuencia correspondiente al oligonucleótido 5', que contiene el codon de iniciación (amarillo) y en rojo la secuencia del oligonucleótido 3'. En azul se muestran los nts que codifican el péptido de unión.



Figura 42. Secuencias de los cDNAs que codifican los dominios V_H y V_L del AcMo 2A10 (anti-CD163) así como el scFv correspondiente. En verde se muestra la secuencia correspondiente al oligonucleótido 5', que contiene el codon de iniciación (amarillo) y en rojo la secuencia del oligonucleótido 3'. En azul se muestra los nts que codifican el péptido de unión.



Figura 43. Secuencias de los cDNAs que codifican los dominios V_H y V_L del AcMo 3B11 (anti-Sn) así como el scFv resultante. En verde se muestra la secuencia correspondiente al oligonucleótido 5', que contiene el codon de iniciación (amarillo) y en rojo la secuencia del oligonucleótido 3'. En azul se muestra los nts que codifican el péptido de unión.

Se compararon cada una de las secuencias correspondientes a las V_H y V_L con las secuencias en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) mediante la aplicación informática *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*, disponible en Internet desde <http://blast.ncbi.nlm.nih.go>), y, como se muestra en la tabla 20, los

mayores porcentajes de homología se obtuvieron con segmentos V de Igs de ratón.

Segmento	1D9	2A10	3B11
V _H	90%	88%	96%
V _L	90%	89%	93%

Tabla 20. Esta tabla muestra el mayor % de homología de cada una de las secuencias V_H y V_L de los diferentes AcMos con secuencias V_H o V_L de Igs de ratón de la base de datos.

Utilizando el programa informático *Wingen* se tradujo la secuencia de DNA correspondiente de cada uno de los scFv a proteína. Las secuencias de aminoácidos obtenidas se muestran en la figura 44.

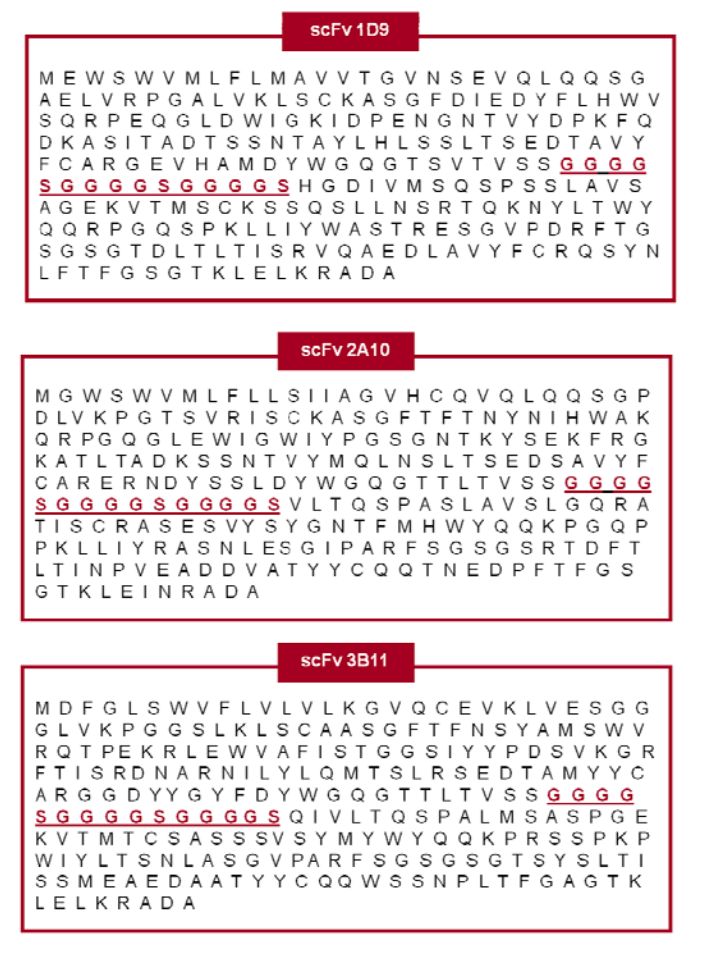


Figura 44. Secuencia de aminoácidos de cada uno de los scFv de los AcMos. En rojo y subrayado se muestra la secuencia correspondiente al péptido de unión.

Ya que estas proteínas recombinantes han sido diseñadas para ser secretadas al medio extracelular, se verificó que en el inicio de las secuencias correspondientes a los diferentes scFv siguiera apareciendo el péptido señal. Para ello se utilizó el servidor *SignalP 3.0* de la Universidad Técnica de Dinamarca (DTU). Los análisis realizados utilizando el modelo de predicción eucariota HMM (*Hidden Markov models*) confirmaron que todas las proteínas recombinantes presentaban dicho péptido. Los porcentajes de predicción y las probables zonas de corte de las pre-proteínas para convertirse en proteínas maduras secretables se muestran en la tabla 21.

Péptido Señal	scFv1D9	scFv 2A10	scFv 3B11
Predicción	Sí (99,9%)	Sí (100%)	Sí (99,8%)
Diana de la peptidasa	Entre la posición 19 y 20	Entre la posición 19 y 20	Entre la posición 19 y 20.

Tabla 21. Resumen de los resultados obtenidos en el servidor *SignalP 3.0*. En la tabla se muestra el porcentaje con el que se predijo la presencia de la secuencia que codificaba el péptido señal en cada uno de los scFv así como también la zona más probable de corte de la peptidasa.

Cada una de las secuencias scFv se clonó en el plásmido pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO, para que los cDNAs correspondientes se expresaran como molécula de fusión con la GFP (ver figura 45 A) y se secuenciaron para comprobar que estas secuencias se encontraran en la misma pauta de lectura que la gfp. Los tamaños de cada una de estas secuencias fueron 1590 nts (scFv 1D9 GFP), 1582 nts (scFv 2A10 GFP) y 1570 nts (scFv 3B11 GFP). Los fragmentos obtenidos se analizaron en geles de agarosa (ver figura 45 B).

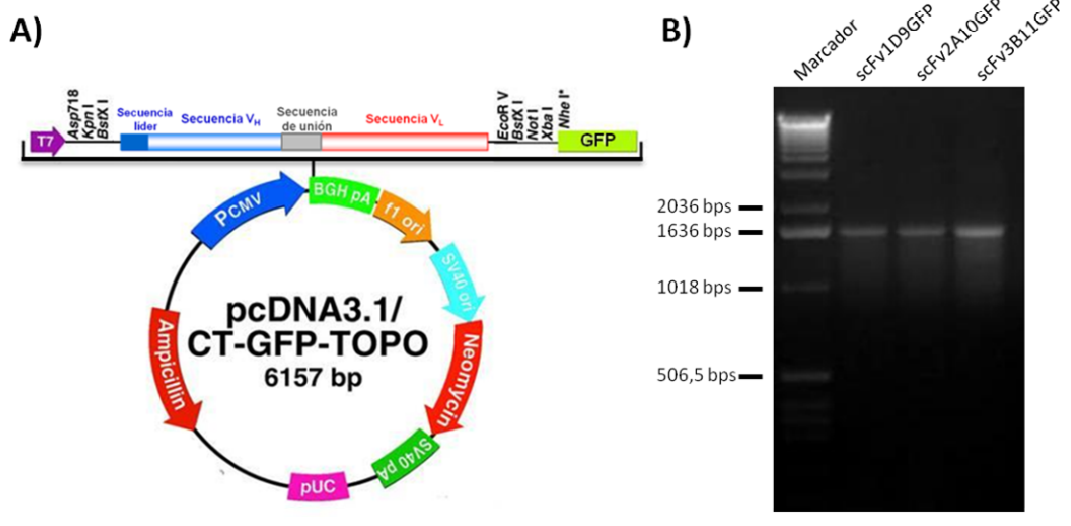


Figura 45. A. Esquema del plásmido que codifica los scFv unidos a GFP.

B. Gel de agarosa al 1,5% en el que se muestran los fragmentos de PCR de los cDNAs que codificaban los correspondientes scFv fusionados a GFP de cada uno de los AcMos. Para la PCR se utilizó el oligonucleótido 5'V_H2 específico de cada secuencia y el oligonucleótido BGH *reverse*, el cual hibrida en el plásmido (ver tabla 4 y 10 de material y métodos). El tamaño de cada uno de los fragmentos es 39 nts mayor al segmento clonado, ya que incluye la zona del plásmido desde el final de la secuencia de la GFP hasta el final de la zona de hibridación del oligonucleótido BGH *reverse*.

7.2. Expresión de las proteínas recombinantes scFv fusionadas a GFP.

Una vez comprobado que los diferentes scFv se habían clonado correctamente, se analizó la expresión de las proteínas recombinantes correspondientes en células CHO. La expresión transitoria de las diferentes construcciones se determinó mediante citometría de flujo detectándose la expresión de GFP en el 20-35% de las células (figura 46).

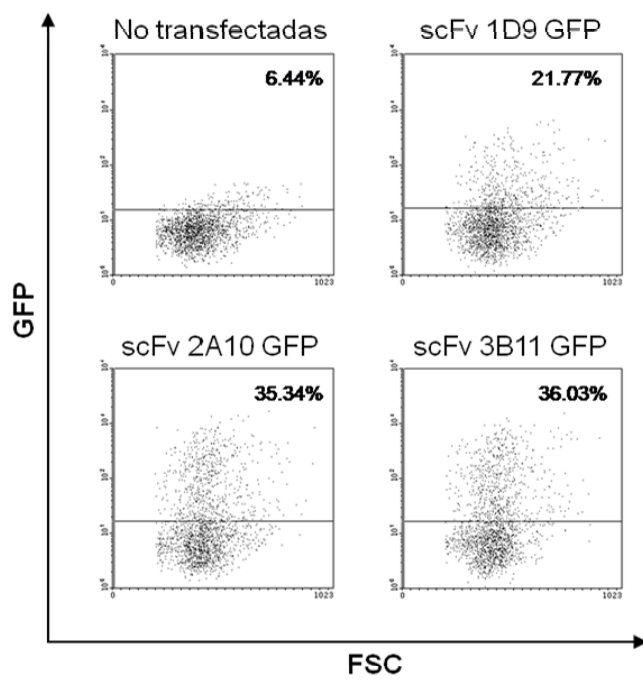


Figura 46. Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de GFP en células CHO transfectadas. Las células transfectadas con cada uno de los plásmidos se recogieron tras 24 horas en cultivo, habiéndolas incubado las últimas 4 horas con monensina para inhibir la secreción de las proteínas al medio extracelular. Como control negativo del análisis se utilizaron células sin transfectar.

También se comprobó mediante *Western blot* utilizando lisados de las células transfectadas que el tamaño de las proteínas recombinantes detectadas coincidía con el tamaño esperado. El tamaño de cada una de las proteínas se calculó utilizando el programa informático *Winpep* (tabla 22). La detección de las proteínas recombinantes se llevó a cabo utilizando un AcMo anti-GFP unido a peroxidasa (figura 47).

Proteína recombinante	Nº aminoácidos	Tamaño
scFv 1D9 GFP	526	58 kDa
scFv 2A10 GFP	523	57,7 kDa
scFv 3B11 GFP	518	56,9 kDa

Tabla 22. En esta tabla se muestra el número de aminoácidos y el tamaño de cada una de las proteínas recombinantes indicadas.

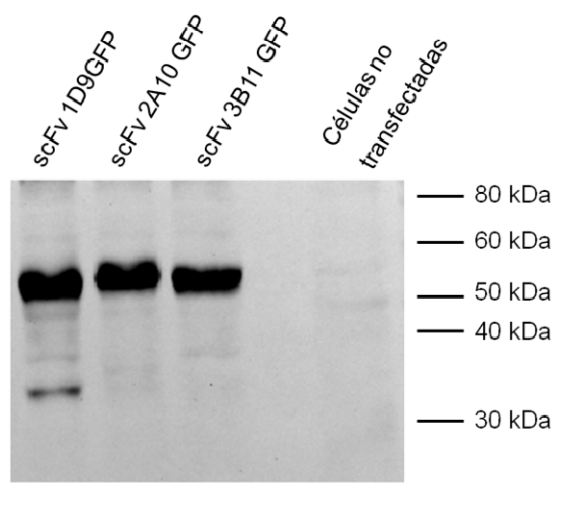


Figura 47. Detección mediante *Western blot* de los fragmentos scFv unidos a GFP en lisados de células CHO transfectadas tratadas con monensina. El gel se realizó al 10% de acrilamida/bisacrilamida en condiciones no reductoras y se reveló con un AcMo anti-GFP unido a peroxidasa. Como control negativo se emplearon lisados de células CHO no transfectadas. Estos resultados son representativos de al menos dos experimentos independientes.

Para poder llevar a cabo la producción de mayores cantidades de las proteínas recombinantes se obtuvieron clones que expresaban de forma estable cada uno de los scFv fusionados a GFP. Como se muestra en apartado 10.2. de material y métodos, se seleccionaron con geneticina las células portadoras de los diferentes plásmidos y se aislaron clones mediante dos rondas de dilución límite. En todos los casos se comprobó que todas las células expresaban la proteína correspondiente (figura 48).

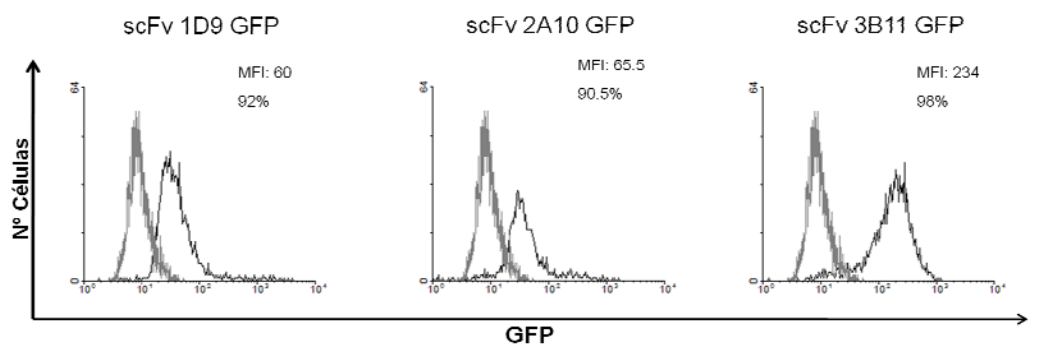


Figura 48. Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de GFP en las células que expresan de manera estable cada una de las construcciones scFv unidas a la misma (histogramas en negro). Las proteínas recombinantes se detectaron utilizando un anticuerpo policlonal frente a GFP unido a Alexa 488. Como control negativo se emplearon células CHO no transfectadas (histogramas en gris).

7.3. Capacidad de unión a su receptor del scFv 2A10 GFP y del scFv 3B11 GFP.

A continuación se procedió a comprobar que los fragmentos scFv, unidos a GFP, conservaban la capacidad de unión a su receptor. Para ello se incubaron macrófagos alveolares con los sobrenadantes de cultivo procedentes de los transfectantes estables que expresaban las proteínas recombinantes scFv 2A10 (anti-CD163) y scFv 3B11 (anti-Sn) fusionadas a GFP. Mientras que estas proteínas se unían a la superficie de los macrófagos, no se observó marcaje cuando este mismo tipo celular se incubó con el sobrenadante de cultivo que contenía la proteína scFv 1D9 GFP (control negativo). (Figura 49 A).

Como puede observarse en las citoextensiones realizadas, la fluorescencia procedente de cada una de las proteínas recombinantes estaba localizada en la superficie celular (Figura 49 B).

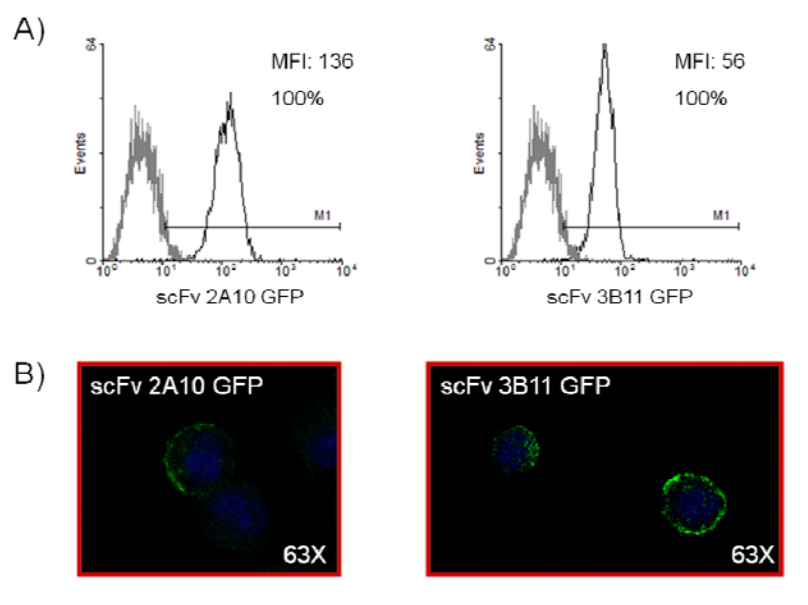


Figura 49. Funcionalidad de las moléculas scFv 2A10 y scFv 3B11 unidas a GFP. Se analizó la unión de las proteínas recombinantes a macrófagos alveolares mediante citometría de flujo (histogramas negros) (A) y citoextensiones (B). En los experimentos de citometría de flujo, la señal fue amplificada utilizando un anticuerpo anti-GFP Alexa 488. Como control negativo (histograma gris) utilizamos sobrenadante de cultivo que contenía la proteína scFv 1D9 GFP. Para detectar las proteínas recombinantes en las citoextensiones se utilizó un anticuerpo anti-GFP unido a biotina, el cual se reveló con estreptavidina unida a FITC. Los ensayos se realizaron con los sobrenadantes de cultivo de cada una de las proteínas recombinantes concentrados 30 veces. Estos resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Para confirmar la especificidad de la unión de las proteínas recombinantes a sus receptores se realizaron experimentos de bloqueo con los AcMos parentales de cada construcción scFv. Estos ensayos consistieron en incubar los macrófagos alveolares con los AcMos 3B11 (anti-Sn) ó 2A10 (anti-CD163) y después con los scFv 3B11 y scFv 2A10 respectivamente. De esta manera, al estar ocupado el receptor al que pueden unirse los scFv, no se observó marcaje. Sin embargo, cuando se incubaron las células con un AcMo frente a un receptor diferente al de la proteína recombinante (1H11, anti-TLR2), no se bloqueó la unión de los scFv, detectándose el marcaje de la GFP (figura 50).

Estos resultados indican que las proteínas scFv fusionadas a GFP se unen de manera específica al receptor reconocido por los AcMos parentales.

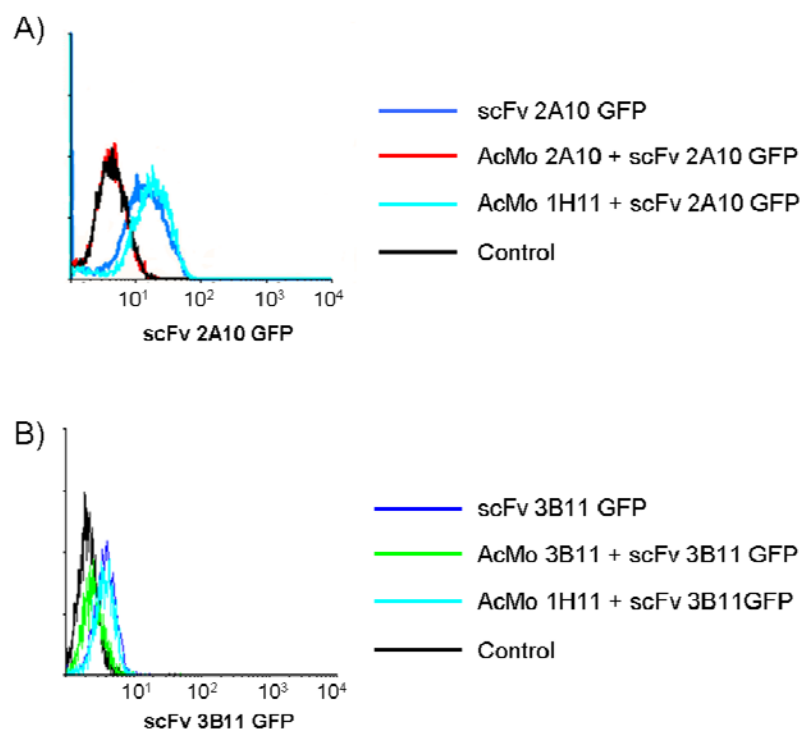


Figura 50. Ensayo de competición del scFv 2A10 GFP (A) y del scFv 3B11 GFP (B). En ambos casos, la unión de las proteínas recombinantes sin incubar previamente con ningún AcMo (—) fue la misma que la detectada cuando las células se incubaron previamente con un AcMo que se une a otro receptor (1H11, anti-TLR2) (—). Sin embargo, al incubar las células con el AcMo 2A10 (—) o el AcMo 3B11 (—) no se detectó fluorescencia cuando posteriormente se añadieron los sobrenadantes de cultivo que contenían la proteína recombinante correspondiente a cada uno de dichos AcMos. En el caso del scFv 2A10 GFP la señal se amplificó con un anticuerpo anti-GFP unido a biotina y se reveló con estreptavidina unida a PE mientras que el scFv 3B11 GFP se detectó directamente. Estos resultados son representativos de tres experimentos independientes.

7.4. Marcaje en tejidos del scFv 2A10 y del scFv 3B11 unidos a GFP.

Para confirmar que las proteínas recombinantes scFv 2A10 y scFv 3B11 mostraban el mismo patrón de marcaje en los ganglios linfáticos y en el bazo que los AcMos parentales, se realizaron análisis inmunohistoquímicos

en estos tejidos utilizando sobrenadantes de cultivo procedentes de los clones estables de cada una de las construcciones concentrados entre 30 y 50 veces.

Como se observa en la figura 51, la proteína recombinante scFv 2A10 unida a GFP reconoce células localizadas en el SCS del ganglio linfático y en la pulpa roja del bazo al igual que el AcMo 2A10. El marcaje del scFv 3B11 unido a GFP en el ganglio linfático se detectó en los senos subcapsular y medular y en la periferia de los folículos, observándose células positivas en el interior de los mismos. En el bazo se observó marcaje con este scFv en células localizadas en el límite entre la pulpa blanca y la pulpa roja, bordeando la zona marginal, y asociadas a las paredes de los vasos elipsoidales.

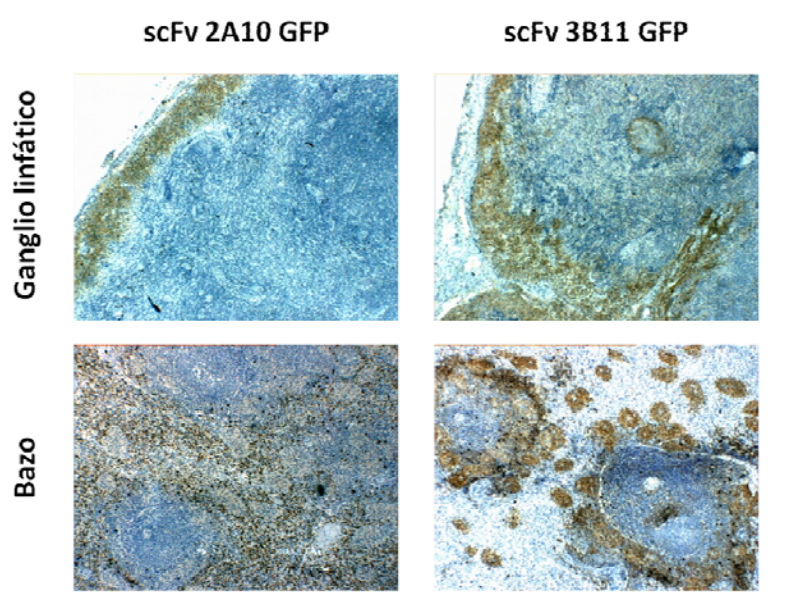


Figura 51. Marcaje de los scFv 2A10 y scFv 3B11 unidos a GFP en el ganglio linfático mediastínico y en el bazo. Las proteínas recombinantes fueron detectadas mediante un anticuerpo anti-GFP biotina, el cual se reveló con estreptavidina unida a HRP y diaminobenzidina. Los sobrenadantes que contenían el scFv 3B11 GFP o el scFv 2A10 GFP se concentraron 30 y 50 veces respectivamente. Los núcleos se tiñeron con hematoxilina. Las fotografías se obtuvieron con una ampliación de 40X.

7.5. Endocitosis de los scFv unidos a GFP.

Para descartar que la monovalencia de los scFv afectase a su internalización, se comprobó que las proteínas recombinantes scFv 2A10 y scFv 3B11 mantenían la capacidad de los AcMos parentales de ser endocitadas después de unirse a sus receptores. Para ello se incubaron macrófagos alveolares con cada uno de los scFv unidos a GFP durante 15, 30, 45 ó 60 minutos a 37°C y sin azida para permitir su internalización. Posteriormente, para eliminar la proteína recombinante unida en la superficie celular, las células se trataron con un tampón de disociación de pH bajo. Como control de máximo marcaje se sometió a las células al mismo tratamiento pero en presencia de azida, bloqueando así la internalización de los receptores.

Al igual que los AcMos de los que proceden, ambas moléculas fueron capaces de endocitarse. Como se muestra en la figura 52, el scFv 2A10 GFP se endocitó de una manera rápida y eficaz. Tras 15 min de incubación a 37°C, aproximadamente el 40% de las células conservaban marcaje con GFP después de ser tratadas con tampón de pH bajo. Este marcaje intracelular aumentó con el tiempo, detectándose, tras 60 minutos de incubación, más de un 65% de células que habían endocitado la proteína recombinante.

La molécula scFv 3B11 GFP también fue capaz de endocitarse pero, al igual que el AcMo 3B11, esta endocitosis se produjo en menor medida y más lentamente que en el caso de las moléculas que se unen al receptor CD163. Tras 60 minutos de incubación, un 15% de las células habían endocitado la proteína recombinante (figura 53).

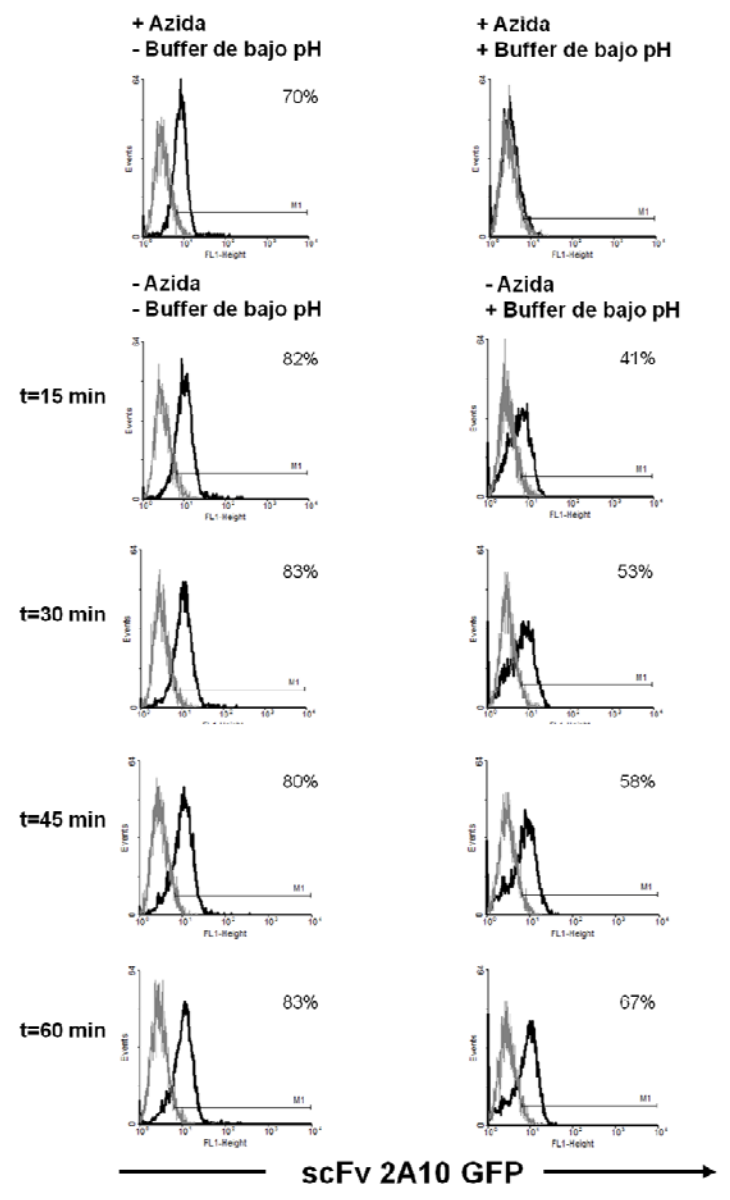


Figura 52. La proteína recombinante scFv 2A10 GFP es endocitada de manera eficaz por los macrófagos alveolares. Los histogramas en negro muestran la fluorescencia de la GFP asociada a la célula tras los diferentes tiempos de incubación a 37°C. Como control de la capacidad del tampón de disociación de eliminar el marcaje en superficie y del marcaje total de la proteína recombinante, se utilizaron células marcadas con el scFv 2A10 GFP a 4°C y con azida en presencia o no del tampón de pH bajo. Los histogramas en gris muestran la unión del scFv 1D9 GFP (control negativo). Estos resultados son representativos de dos experimentos independientes.

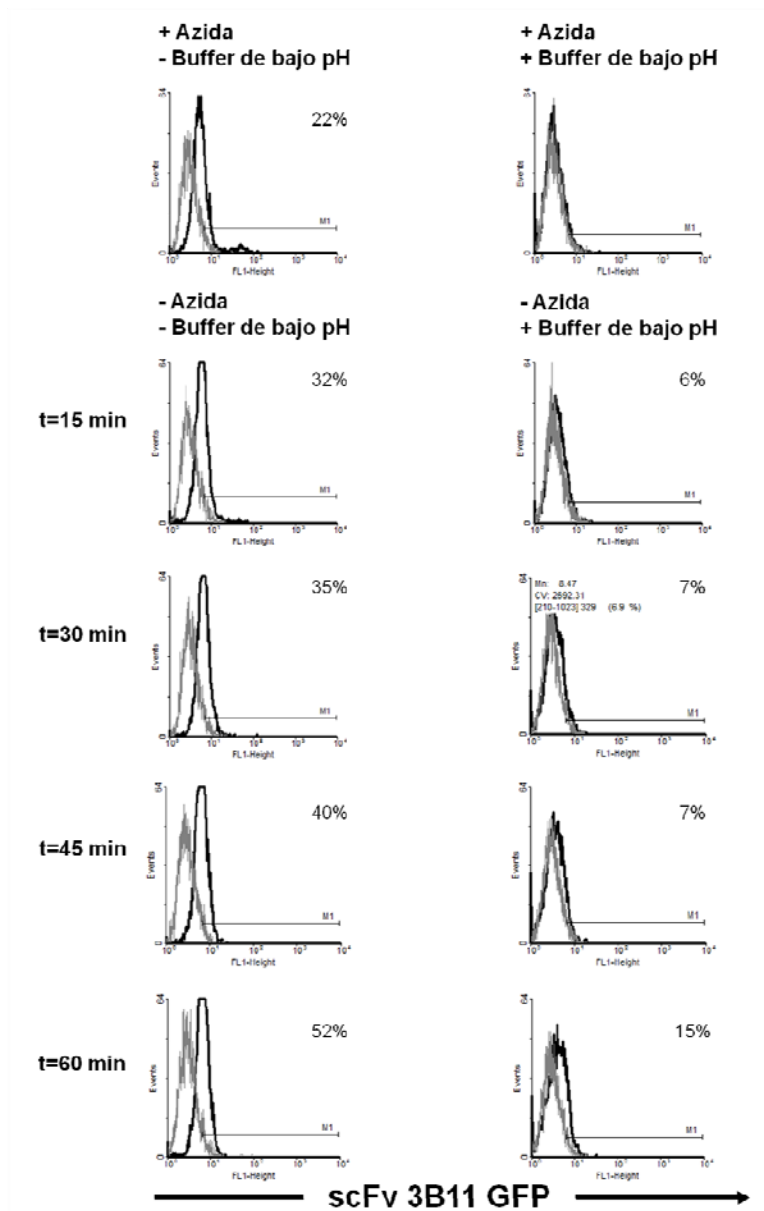


Figura 53. El scFv 3B11 es endocitado por los macrófagos alveolares. Los histogramas en negro muestran la fluorescencia de la GFP asociada a la célula tras diferentes tiempos de incubación a 37°C. Se incubaron células marcadas con el scFv 3B11 GFP a 4°C y con azida en presencia o no del tampón de pH bajo como control de la capacidad del tampón de disociación de eliminar el marcaje en superficie y del marcaje total de la proteína recombinante respectivamente. Los histogramas en gris muestran la unión del scFv 1D9 GFP (control negativo). Estos resultados son representativos de dos experimentos independientes.

8. Generación de las moléculas scFv unidas a la proteína N del virus del SRRP.

Una vez que se confirmó la funcionalidad y especificidad de las proteínas scFv 3B11 y scFv 2A10, se procedió a fusionar cada uno de estos scFv a la proteína N del virus del SRRP, la cual se empleó como Ag modelo en los posteriores estudios inmunológicos.

8.1. Construcción de los plásmidos que codifican los scFv unidos a la proteína N del SRRP.

En nuestro laboratorio disponíamos del plásmido pcDNA 3.1 (+) con la secuencia del ORF7 del virus del SRRP incorporada, la cual codifica la nucleoproteína o proteína N de dicho virus, junto con un espaciador (sp) al inicio de la misma (spORF7).

Se diseñaron oligonucleótidos específicos de cada una de las secuencias de los scFv para añadir, mediante PCR, las dianas de restricción seleccionadas para incorporar el ORF7 del virus del SRRP. Estas dianas de restricción debían de cumplir varios requisitos; por un lado, su secuencia no debía de aparecer dentro de la secuencia de los scFv y, por otro lado, debían de estar localizadas en el sitio de clonaje múltiple del plásmido antes de la secuencia del spORF7, para que así la proteína de fusión estuviera orientada con el scFv en el extremo N-terminal y la proteína N en el extremo carboxi-terminal. Además, en los casos en los que fue posible, se seleccionaron dianas de restricción diferentes para que el clonaje fuera direccional. De las posibles dianas de restricción que cumplían estas condiciones se eligieron BamH I y/o Hind III, ya que las enzimas que cortan específicamente en estas secuencias son de uso habitual en el laboratorio. En las secuencias del scFv 1D9 y del scFv 2A10 se añadió sólo una diana (BamHI y Hind III respectivamente) ya que la secuencia correspondiente a la otra diana seleccionada aparecía dentro de la secuencia del scFv. El clonaje del scFv 3B11 fue direccional, incorporándose ambas dianas de restricción, cuyas enzimas comparten la misma temperatura óptima de incubación (37°C) y de inactivación (65°C), así como también el tampón recomendado por la casa comercial para su máxima actividad, lo cual permitió realizar la digestión de este scFv de manera más sencilla (Ver apartado 10.1.5 de material y métodos).

Series
IX I **Secuencia** **Radiación V** **Secuencia** **Radiación V**
Serie V
IX I **Secuencia** **Radiación V** **Secuencia** **Radiación V**

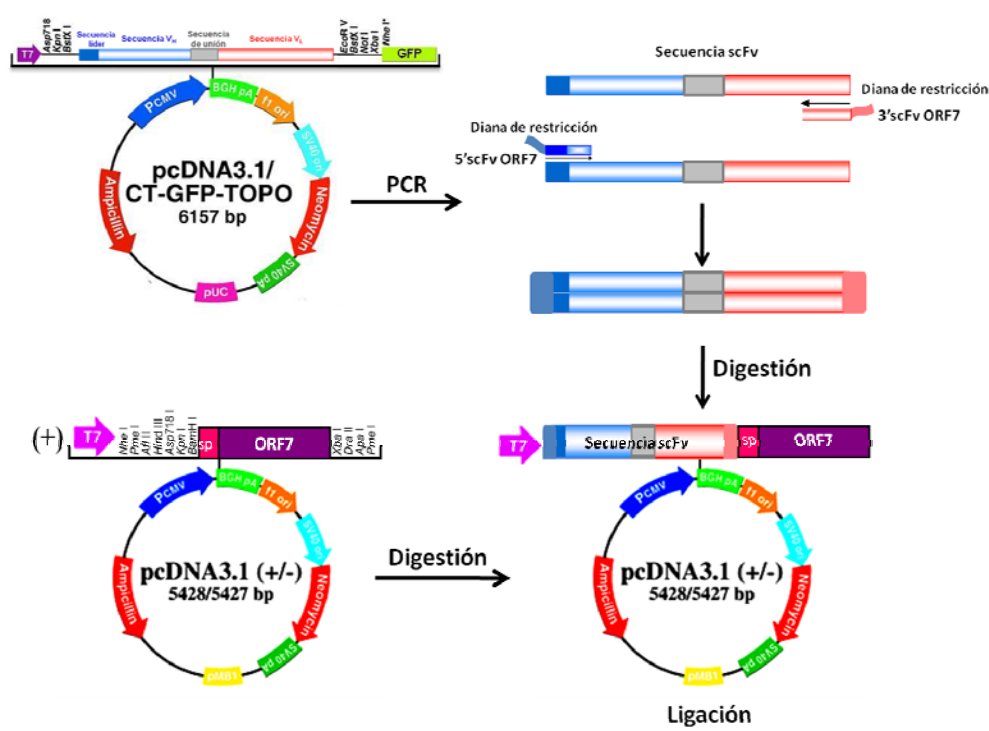


Figura 54. Esquema del clonaje de las secuencias que codifican los scFv en el plásmido que contiene la secuencia spORF7 del VSRRP.

Construcciones	Número de nts
spORF7	24 nts del espaciador + 387 nts de la ORF7 (411 nts)
scFv 1D9 ORF7	801 nts del scFv1D9 + 411 nts del spORF7 (1212 nts)
scFv 2A10 ORF7	829 nts del scFv 2A10 + 411 nts del spORF7 (1240 nts)
scFv 3B11 ORF7	802 nts del scFv3B11 +411 nts del spORF7 (1213 nts)

Tabla 23. Confirmación de las secuencias nucleotídicas de los clones seleccionados. En la tabla se muestra el número de nucleótidos (nts) de cada una de las construcciones, incluyéndose los nts incorporados correspondientes a las dianas de restricción.

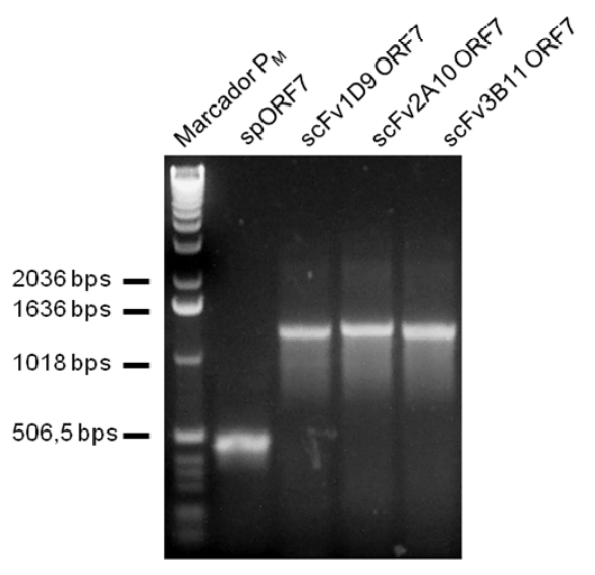


Figura 55. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1,5% en el que se muestran los fragmentos de PCR correspondientes al spORF7 y a los scFv 1D9, 2A10 y 3B11 unidos al mismo. Los oligonucleótidos utilizados fueron los específicos para cada secuencia en 5' y el oligonucleótido BGH *reverse*.

8.2. Expresión de las proteínas recombinantes scFv unidas a la Proteína N del virus del SRRP.

Para comprobar si el clonaje de las nuevas construcciones se había realizado de manera adecuada se expresaron cada una de las proteínas recombinantes en células CHO mediante transfección con lipofectamina. En todos los casos, tras inhibir la secreción de proteínas mediante monensina y permeabilizar las células con metanol, fue posible detectar la Proteína N con el AcMo 1CH5 y un anticuerpo producido en conejo que reconoce Igs de ratón unido a FITC. Según el scFv-Proteína N transfectado, se detectaron entre un 40-58% de células positivas para la proteína N (figura 56).

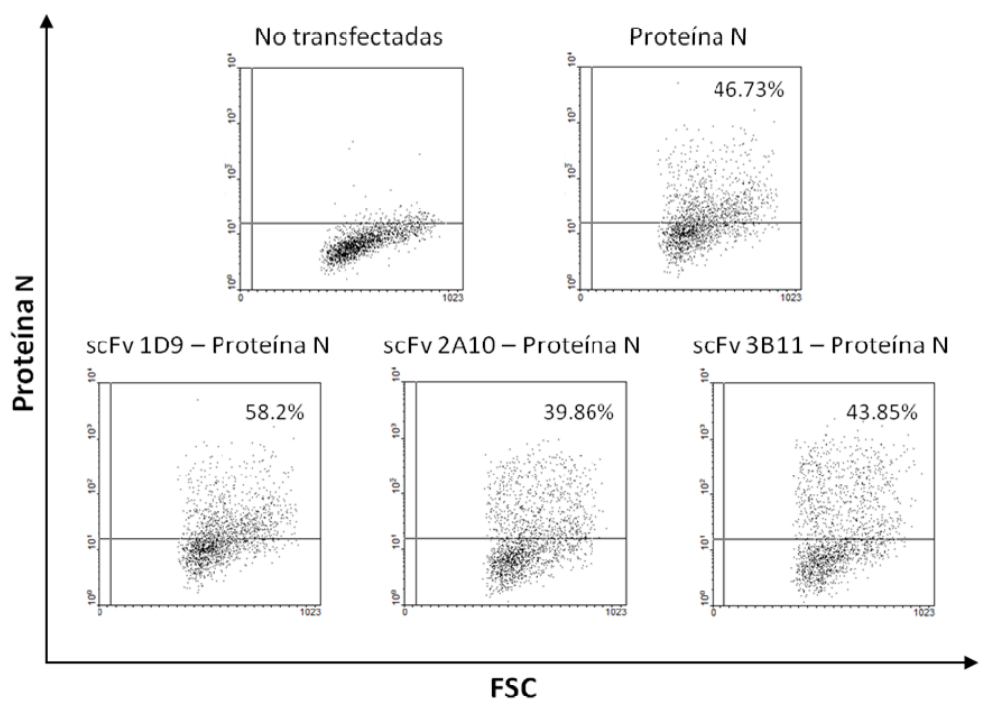


Figura 56. Análisis mediante citometría de flujo del perfil de expresión de la Proteína N del virus del SRRP sola o como molécula de fusión con los diferentes scFv en células CHO transfectadas de manera transitoria con lipofectamina. Como control negativo se utilizaron células sin transfectar.

Posteriormente se comprobó mediante *Western Blot* el tamaño de las proteínas recombinantes en lisados de las células que expresaban de manera transitoria la proteína N o cada uno de los scFv unidos a ésta (Figura 57). El tamaño de cada una de las proteínas se estimó utilizando el programa informático *Winpep* (tabla 24). Como puede observarse, los pesos moleculares obtenidos en el gel de poliacrilamida para cada uno de los fragmentos scFv unidos a proteína N coinciden con el peso molecular calculado empleando el programa *Winpep*. Por tanto se comprobó que, como hacían prever los datos de secuenciación, las secuencias que codificaban los scFv estaban en la misma pauta de lectura del ORF7 del virus del SRRP contenido en el plásmido en el que se clonaron.

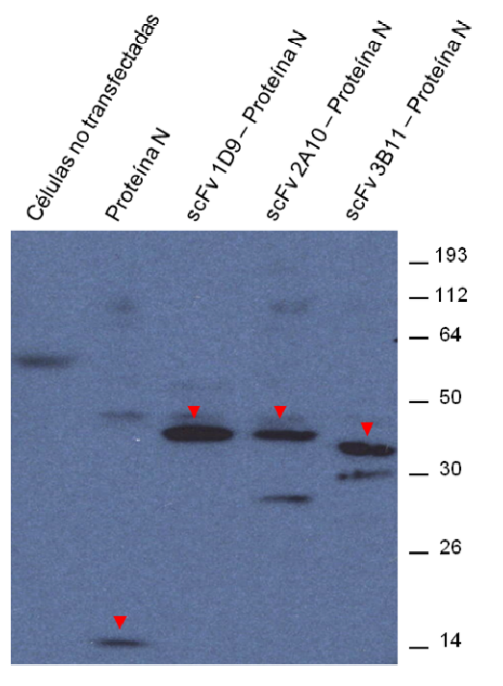


Figura 57. Detección mediante *Western Blot* de los fragmentos scFv 1D9, scFv 2A10 y scFv 3B11 unidos a la proteína N del virus del SRRP en lisados de células CHO transfectadas tratadas previamente con monensina. El gel se realizó al 10% de acrilamida/bisacrilamida en condiciones no reductoras y las proteínas recombinantes se detectaron utilizando el AcMo anti-Proteína N (1AC7) y un anticuerpo que reconoce Igs de ratón unido a peroxidasa. Las bandas específicas del tamaño adecuado se indican con flechas. Como control negativo, se emplearon lisados de células CHO no transfectadas. Estos resultados son representativos de dos experimentos independientes.

Proteína recombinante	Nº aminoácidos	Tamaño
Proteína N	129	14,2 kDa
scFv 1D9 - proteína N	402	42,9 kDa
scFv 2A10 - proteína N	411	44 kDa
scFv 3B11 - proteína N	401	42,8 kDa

Tabla 24. Número de aminoácidos y peso molecular de cada una de las proteínas recombinantes. En el número de aminoácidos y peso molecular se incluyeron los aminoácidos correspondientes al péptido señal ya que el *Western Blot* se realizó con lisados celulares. En el caso de la proteína N, no se incluyó el espaciador ya que no tiene codon de iniciación.

Para la producción a mayor escala de estas proteínas recombinantes se generaron, en células CHO, clones que expresaban de forma estable la nucleoproteína del virus del SRRP así como los distintos scFv unidos a ésta. Para ello se seleccionaron con geneticina las células portadoras del plásmido y se aislaron clones mediante dos rondas de dilución límite. En todos los casos se obtuvo una única población que expresaba la proteína correspondiente (figura 58).

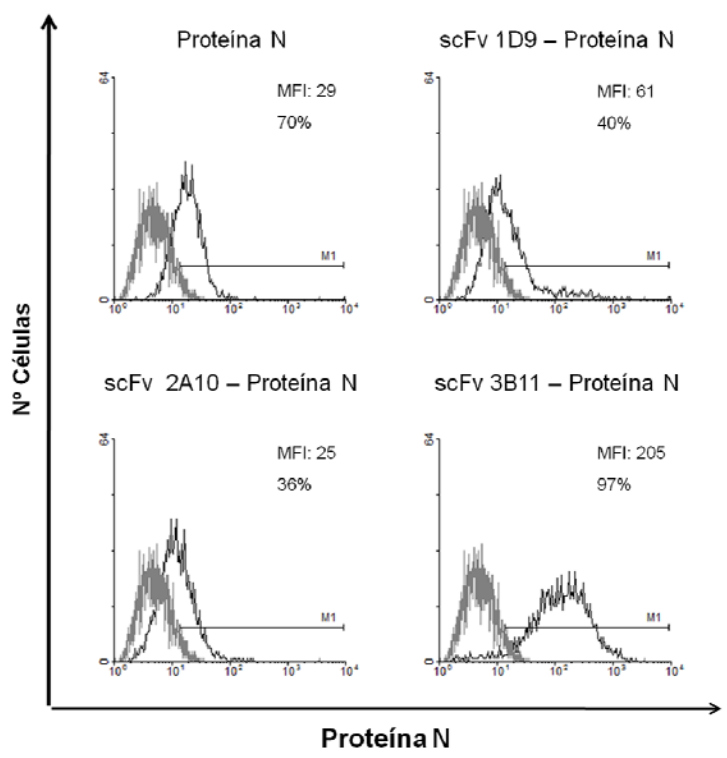


Figura 58. Análisis por citometría de flujo de la expresión de la proteína N y de las construcciones scFv unidas a ésta. La detección de la proteína N se realizó, tras permeabilizar las células con metanol, utilizando el AcMo 1CH5 y un anticuerpo que reconoce Igs de ratón unido a FITC. Los histogramas en negro muestran el perfil de expresión de los clones productores de cada una de las proteínas. Como control negativo se utilizaron células no transfectadas (histogramas en gris).

8.3. Capacidad de unión al receptor de las proteínas recombinantes scFv unidas a la Proteína N del virus del SRRP.

A continuación se procedió a comprobar que los fragmentos scFv unidos a proteína N mantenían la capacidad de unión a su receptor. Para ello se incubaron macrófagos alveolares con los sobrenadantes de cultivo

procedentes de los transfectantes estables para las proteínas recombinantes scFv 3B11 y scFv 2A10 unidas a la Proteína N. Esta unión se detectó utilizando el AcMo 1CH5, que reconoce la proteína N, seguido de un anticuerpo que reconoce Igs de ratón unido a FITC, y se analizó mediante citometría de flujo.

Mientras que las moléculas scFv 2A10 y scFv 3B11 se unían a la superficie de los macrófagos alveolares, no se observó marcaje cuando este mismo tipo celular se incubó con el sobrenadante de cultivo que contenía el scFv 1D9 unido a la Proteína N o la proteína N sola. (figura 59).

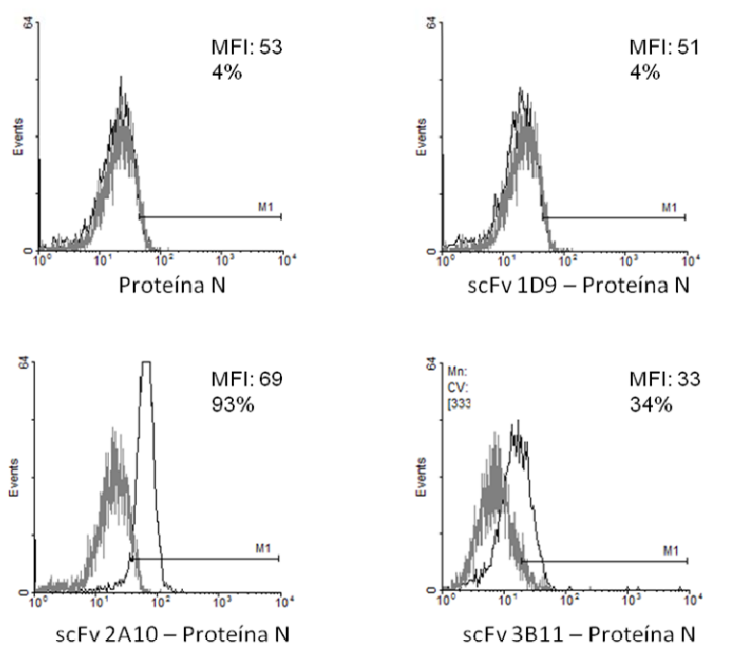


Figura 59. Funcionalidad de las moléculas scFv 2A10 y scFv 3B11 unidas a la Proteína N.

Se analizó la unión de las proteínas recombinantes a macrófagos alveolares mediante citometría de flujo incubando macrófagos alveolares con los sobrenadantes de cultivo de cada uno de los clones concentrados 50 veces (histogramas negros). La proteína N se detectó utilizando el AcMo 1CH5 y un anticuerpo que reconoce Igs de ratón unido a FITC. Para confirmar que la Proteína N y el scFv 1D9 – Proteína N no se unían a macrófagos, se comparó su perfil de marcaje con el obtenido con sobrenadante de cultivo de células no transfectadas (histogramas grises). En el caso de los sobrenadantes scFv 2A10 y scFv 3B11 unidos a la proteína N se utilizó como control negativo sobrenadante de cultivo del scFv 1D9 - proteína N (histogramas grises). Estos resultados son representativos de al menos seis experimentos independientes.

Para confirmar la especificidad de esta unión se realizaron experimentos de bloqueo en los cuales se incubaron macrófagos alveolares con los AcMos parentales 3B11 ó 2A10 y posteriormente se añadieron las proteínas recombinantes scFv3B11 o scFv 2A10 unidas a la proteína N del virus del SRRP. Todos los sobrenadantes de cultivo fueron concentrados 50 veces. Para detectar la proteína N se incubaron las células con el AcMo 1CH5 y un anticuerpo específico frente IgG2b de ratón unido a PE.

Como se puede observar en los perfiles obtenidos mediante citometría de flujo, mientras que los AcMos parentales bloquearon la unión de los respectivos scFv a los macrófagos, no se observó ninguna inhibición en el marcaje cuando las células se incubaron con un AcMo frente a otro receptor (figura 60).

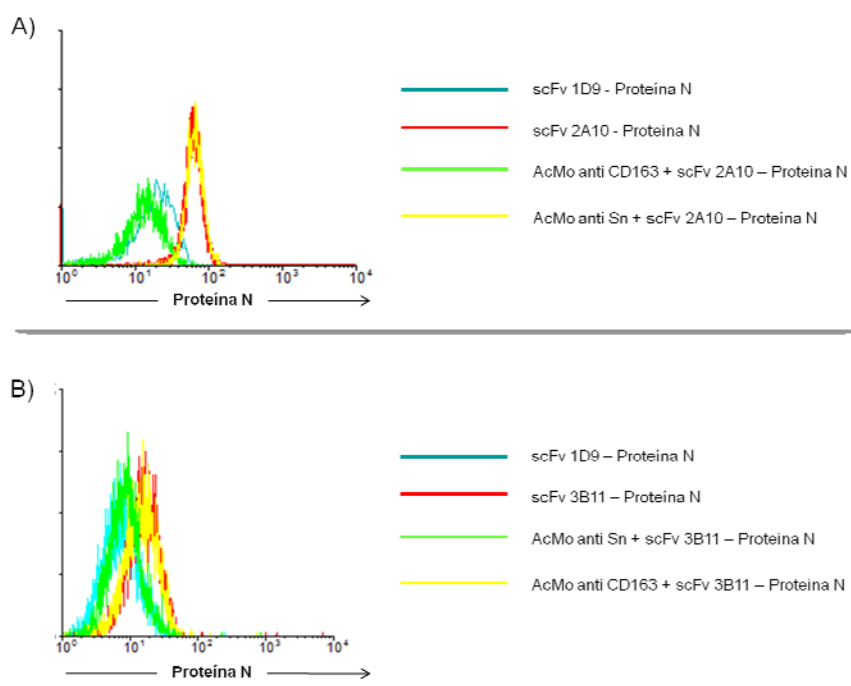


Figura 60. Especificidad de las proteínas recombinantes scFv 2A10 y scFv 3B11 unidas a la Proteína N. En esta figura se muestra el ensayo de competición para el scFv 2A10 (A) y para el scFv 3B11 (B) unidos a la proteína N. Como se puede observar en ambos casos, la unión de la proteína recombinante sin incubar previamente con ningún AcMo (—) es la misma que la detectada cuando las células se incubaron previamente con un AcMo que se une a otro receptor (—). Sin embargo, al incubar previamente las células con sus AcMos parentales respectivos no se detecta fluorescencia (—). Como control negativo se utilizó el scFv 1D9 unido a proteína N (—). Estos resultados son representativos de dos experimentos independientes.

9. Evaluación de la capacidad de los scFv para mejorar la inmunogenicidad en un modelo de vacunación de DNA.

Para evaluar *in vivo* la capacidad adyuvante de las construcciones scFv fusionadas a la proteína N del virus del SRRP, realizamos un ensayo de vacunación con DNA. Debido a las limitaciones en el número de animales que se podían manejar en nuestras instalaciones, seleccionamos el scFv 3B11 unido a la proteína N ya que el AcMo del que procede fue el que había mostrado un mejor comportamiento tanto a nivel de respuesta humoral como celular.

Para llevar a cabo el ensayo se inmunizaron grupos de 5 cerdos con 3 dosis, con intervalos de dos semanas entre cada una de ellas, de 500 µg del plásmido que codifica la proteína recombinante scFv 3B11-Proteína N, el scFv 1D9-Proteína N, la nucleoproteína sola o el plásmido pcDNA 3.1(+) vacío. Posteriormente se realizó una inmunización de los animales con una vacuna inactivada como pseudo-desafío debido a la imposibilidad de realizar una infección experimental en nuestras instalaciones. Se recogieron muestras de suero de los animales a día 0 y a las 2, 4, 6, 7 y 8 semanas y sangre periférica para los estudios de linfoproliferación a las 4, 6 y 8 semanas (ver figura 61).

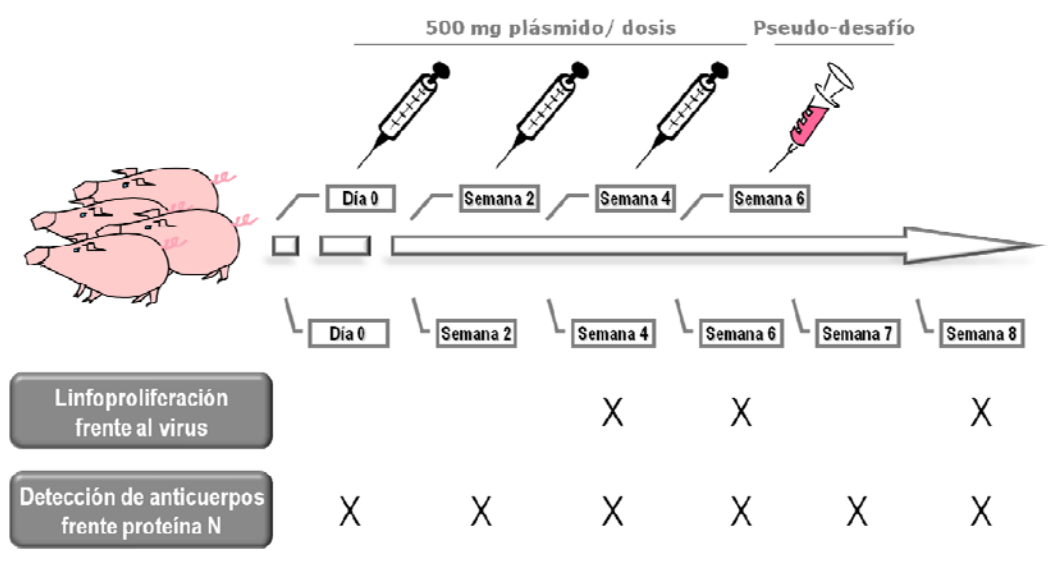


Figura 61. En el esquema se representa la pauta de inmunización y los tiempos de recogida de muestras del ensayo realizado para comprobar la eficacia de dirigir la Proteína N del virus del SRRP al receptor Sn *in vivo* en un modelo de inmunización con DNA.

Cuando se cuantificó la producción de anticuerpos específicos frente a la proteína N en los sueros de los animales, se observó una mejora en la respuesta humoral de los animales inmunizados con el plásmido que contenía la secuencia que codificaba el scFv 3B11 fusionado a la proteína N. En la 6ª semana de ensayo, tras las 3 dosis de DNA, sólo se observó una ligera producción de anticuerpos frente a la proteína N en dos animales del grupo inmunizado con el scFv 1D9 ORF7 y en dos animales del grupo inmunizado con scFv 3B11 ORF7. Sin embargo, 7 días después del pseudo-desafío (semana 7) comenzó a detectarse un aumento en la producción de anticuerpos específicos. En los sueros de tres animales pertenecientes al grupo inmunizado con el plásmido que codifica la proteína N (spORF7) y de un animal inmunizado con el plásmido scFv 1D9 ORF7 se detectaron bajas cantidades anticuerpos específicos, mientras que en el suero de un cerdo de este último grupo los niveles de anticuerpos frente a la proteína N fueron algo superiores. Sin embargo, en el caso del grupo inmunizado con el plásmido que codifica el scFv 3B11 unido a la proteína N, tanto el número de animales que presentaban anticuerpos específicos frente a la nucleoproteína del virus del SRRP (cuatro animales de cinco) como los niveles de anticuerpos detectados, fueron superiores a los de los grupos control (ver figura 62).

14 días después de la inmunización con la vacuna inactivada (semana 8), el número de animales respondedores y los niveles séricos de anticuerpos específicos seguían siendo superiores en el grupo inmunizado con el plásmido scFv 3B11 ORF7. Se detectó una producción de anticuerpos específicos baja en los sueros de dos animales inmunizados con el plásmido spORF7 y de tres animales inmunizados con el plásmido scFv 1D9 ORF7, existiendo otro animal inmunizado con el plásmido spORF7 que mostraba una producción mayor de anticuerpos en suero. Sin embargo, en el grupo inmunizado con el scFv 3B11 ORF7 se detectaron anticuerpos específicos en los sueros de 4 de los 5 animales, siendo la producción de anticuerpos media de este grupo el doble que la de los animales de los grupos control. Además, los niveles de anticuerpos detectado en este grupo en la octava semana del ensayo fueron superiores a los presentaban en la semana anterior (ver figura 62).

Aunque las diferencias observadas no son estadísticamente significativas debido a la gran dispersión de los datos y al reducido número de animales

de la muestra los resultados obtenidos sugieren que dirigir la proteína N a la molécula de Sn en un modelo de vacunación con DNA puede ser un método eficaz para primar las células favoreciendo que la respuesta secundaria se desencadene de forma más rápida y eficaz.

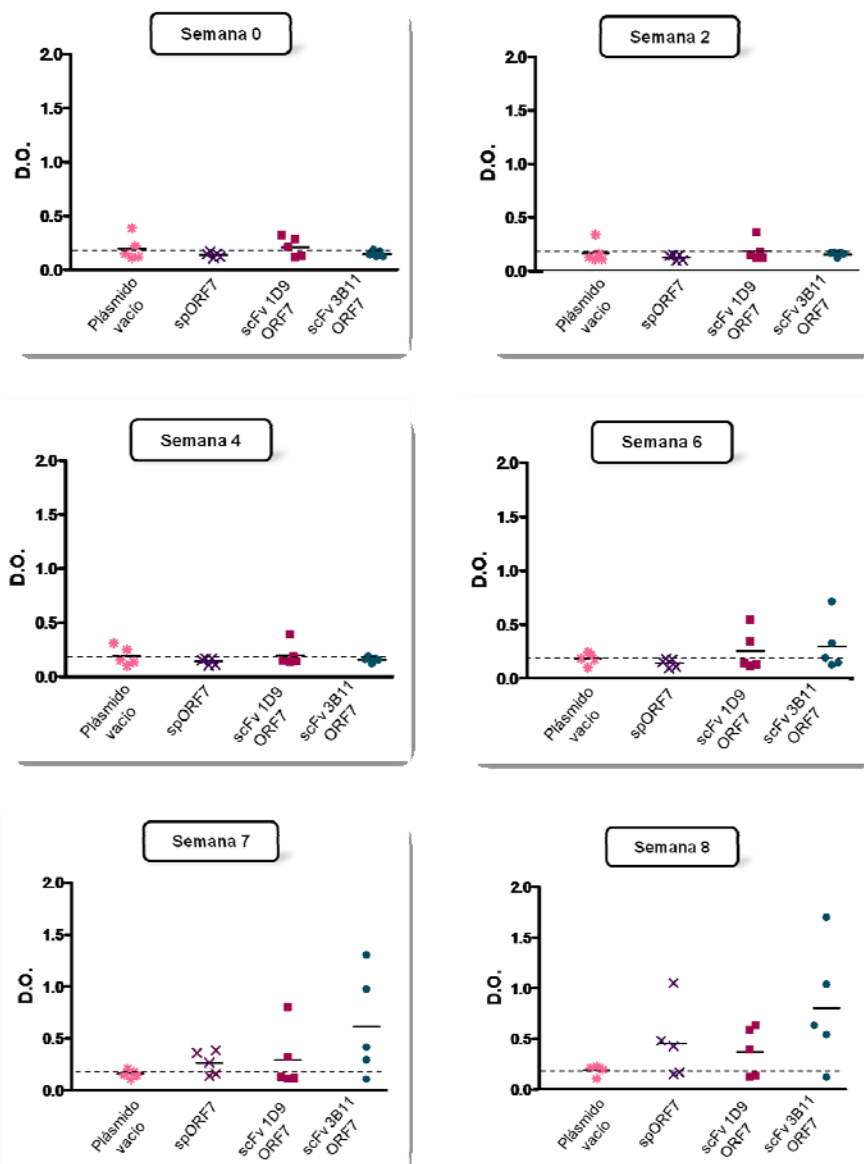


Figura 62. Respuesta humoral detectada en el estudio de inmunización con DNA. En la gráfica se muestran la producción de anticuerpos frente a proteína N en los sueros de los animales inmunizados con el plásmido vacío o las construcciones spORF7, scFv 1D9 ORF7 o scFv 3B11 ORF7 a tiempo 0, 2, 4, 6, 7 y 8 semanas. Los datos que se muestran corresponden a los resultados de D.O. de un Elisa realizado con diluciones 1/10 de los sueros de todos los animales, previamente incubados con extracto de E.coli. El análisis estadístico se realizó utilizando el test de Mann-Whitney.

Por otro lado se realizaron ensayos de linfoproliferación utilizando las CMSP procedentes de los cerdos inmunizados con los diferentes plásmidos. Para ello, se recogieron muestras de sangre periférica a 4, 6 y 8 semanas, la cual se procesó y se cultivó con diferentes cantidades del virus del SRRP. En ninguno de los grupos a los tiempos señalados se obtuvieron niveles de proliferación detectables en un ensayo de incorporación de timidina tritiada.

DISCUSIÓN

El desarrollo de vacunas más efectivas es la mejor alternativa para conseguir el control integral y la prevención de enfermedades infectocontagiosas de los animales. Esto exige el conocimiento de las interacciones patógeno-huésped y del sistema inmune de las diferentes especies animales ya que existen diferencias importantes entre ellas en lo que se refiere al tropismo de diferentes patógenos o a los sensores implicados en la inmunidad innata, limitando en muchos casos el valor de los datos procedentes de sistemas modelo (Hein and Griebel, 2003). La mayoría de las vacunas que se utilizan actualmente en Sanidad Animal están basadas en el empleo de patógenos atenuados o inactivados. Estas vacunas, aunque son eficaces en muchos casos, presentan algunos inconvenientes. Así, las vacunas inactivadas son malas inductoras de inmunidad celular, lo que supone un problema en la protección frente a patógenos intracelulares, mientras que las vacunas basadas en virus atenuados presentan el riesgo de escapes y de reversión a formas más virulentas. Por ello, en los últimos años, muchos grupos de investigación han centrado sus estudios en desarrollar nuevas estrategias de vacunación más seguras basadas en el empleo de proteínas, péptidos, DNA, RNA y vectores virales entre otros. Sin embargo, a pesar de los buenos resultados obtenidos en sistemas experimentales, las expectativas de su uso en el hombre y en especies de interés ganadero no se han cumplido por el momento, debido, entre otras razones, a su menor inmunogenicidad respecto de las vacunas tradicionales.

En la generación de la respuesta inmune las APCs son las responsables de captar, procesar y presentar el Ag a los linfocitos, dando lugar a la iniciación de la respuesta inmune Ag-específica. La interacción de las APCs con los linfocitos T constituye un punto crítico en la fase temprana de la generación de una respuesta inmune específica. De la frecuencia e intensidad de estas interacciones dependen, en gran medida, la magnitud y el tipo de respuesta generada (Guermonprez et al., 2002). Por ello, entre los diferentes abordajes que se están estudiando para aumentar la eficacia de las vacunas recombinantes, destaca el que tiene como objetivo mejorar la presentación antigénica a los linfocitos mediante el empleo de vectores que faciliten la captación y/o el procesamiento del Ag por las APCs (Romani et al., 2010; Shortman and Liu, 2002; Tacke et al., 2007). El empleo de anticuerpos o ligandos específicos de receptores expresados en APCs,

fusionados a Ags relevantes, puede favorecer la captación y/o el procesamiento del Ag y mejorar la respuesta inmune específica. Los criterios que debe cumplir un receptor para servir como diana a la que dirigir el Ag son el tener un patrón de expresión lo más restringido posible a APCs, ser endocítico y que la internalización del Ag lleve al procesamiento y presentación del mismo vía moléculas del MHC. En el modelo de ratón se ha conseguido mejorar tanto la respuesta humoral como celular dirigiendo Ags virales, tumorales o proteínas modelo a receptores de la familia de lectinas de tipo C (Bonifaz et al., 2002; Bonifaz et al., 2004; Caminschi et al., 2008; Carter et al., 2006; Corbett et al., 2005), integrinas (Castro et al., 2008), moléculas coestimuladoras (Boyle et al., 1998; Deliyannis et al., 2000), *siglecs* (Zhang et al., 2006), o receptores tipo *Toll* (Jackson et al., 2004; Prajeeth et al., 2010; Zhu et al., 2004) entre otros. El tipo y la eficacia de la respuesta inducida se ha relacionado fundamentalmente con el patrón de expresión del receptor, la biología del mismo y la co-inoculación o no de diferentes adyuvantes. En este trabajo hemos demostrado que dirigir Ag a Sn, CD163 y TLR2, todas ellas moléculas expresadas principalmente en células de la línea mielomonocítica, es un método eficaz para aumentar la inmunogenicidad en la especie porcina.

El prototipo de APCs ha sido durante mucho tiempo la DC, sin embargo, en los últimos años han aparecido diversos trabajos que señalan un papel relevante como APCs de los macrófagos. Ya en la década de los 90, diversos trabajos *in vitro* pusieron de manifiesto que estas células podían actuar como APCs (Muerkoster et al., 1999), estimulando a linfocitos T CD4 (Hsieh et al., 1993a; Hsieh et al., 1993b; Nair et al., 1995) y CD8 (Apostolopoulos et al., 2000; Kovacsovics-Bankowski and Rock, 1994; Rock et al., 1993). Los macrófagos son capaces de iniciar respuestas inmunes específicas a través del procesamiento y presentación antigénicos, la expresión de moléculas coestimuladoras y la producción de citoquinas (Pozzi et al., 2005). Además, los macrófagos Sn⁺ del SCS de los ganglios linfáticos y de la zona marginal del bazo están implicados en la captación de algunos patógenos que llegan a los órganos linfoides, en la iniciación de la respuesta inmune y tienen un papel relevante en el control de la diseminación de diversos virus (Asano et al., 2010; Backer et al., 2010; Barral et al., 2010; Carrasco and Batista, 2007; Iannacone et al., 2010; Junt et al., 2007; Phan and Chtanova, 2010; Phan et al., 2007).

Por su parte los monocitos, además de poder actuar como APCs (Chamorro et al., 2000), han sido descritos como precursores de DCs tanto *in vitro* (Chamorro et al., 2004) como *in vivo* (Leon et al., 2007). *In vitro*, las DCs derivadas de monocitos porcinos muestran un aumento en la expresión de SLA I, SLA II y CD80/86 y una gran capacidad de inducir la proliferación de células T (Chamorro et al., 2004). *In vivo*, en estudios basados en la infección por *Leishmania major* los monocitos son reclutados de forma masiva hacia los lugares de inoculación del patógeno, diferenciándose a DCs que expresan altos niveles de MHC II, CD40 y CD86 y tienen la capacidad de migrar hacia los ganglios linfáticos y desencadenar una respuesta T_H1 (Leon et al., 2007).

Los receptores seleccionados en esta tesis como dianas a los que dirigir Ag, el CD163, el TLR2 y la Sn, se expresan en subpoblaciones celulares con capacidad de actuar como APCs. El CD163 es un receptor expresado en macrófagos, en una subpoblación de monocitos con una gran capacidad para estimular a las células T (Chamorro et al., 2005; Sanchez et al., 1999) y en subpoblaciones de DCs dérmicas (Marquet et al., 2011). Por otra parte, el TLR2 porcino se expresa en monocitos, macrófagos alveolares y MoDC (Alvarez et al., 2008). Cabe destacar que al dirigir Ag al TLR2, se pueden combinar dos estrategias ya que no sólo se favorece la captación del mismo, sino que además la señalización a través de este receptor puede inducir la activación de las APCs. Esta activación aumenta la expresión de moléculas coestimuladoras e induce la secreción de factores inflamatorios y quimiotácticos que mejoran la presentación antigénica por parte de las APCs y afectan al desarrollo tanto de la inmunidad innata como de la adquirida ((Medzhitov et al., 1997; Michelsen et al., 2001). Finalmente, la distribución celular de la Sn porcina es parecida a la descrita en humanos (Hartnell et al., 2001; Kirchberger et al., 2005) ya que se expresa en subpoblaciones de macrófagos, en algunas DC localizadas en órganos linfoides secundarios y en MoDC. No obstante, se han encontrado diferencias entre especies en el nivel de expresión de esta molécula en las subpoblaciones de macrófagos. Así, mientras que en el cerdo Sn se expresa a niveles altos en macrófagos alveolares y bajos en macrófagos de la médula ósea (Ezquerro et al., 2009), en rata ocurre lo contrario (Crocker et al., 1988; van den Berg et al., 1996). Esto no es algo inesperado ya que existen importantes diferencias entre especies en la regulación de la expresión de Sn por citoquinas, factores de

suero o glucocorticoides (Crocker et al., 1988; Hartnell et al., 2001; McWilliam et al., 1992; van den Berg et al., 1996). Como demuestran nuestros resultados, al igual que ocurre en humano y ratón (Crocker and Gordon, 1989; Hartnell et al., 2001), los monocitos porcinos no expresan Sn, pero se puede inducir su expresión en estas células en presencia de IFN α (Delputte et al., 2007) y, en menor medida, tras su cultivo con suero porcino.

La endocitosis de la Sn, del CD163 y del TLR2 había sido descrita en varias especies animales, entre ellas el cerdo (Bover et al., 2007; Jackson et al., 2004; Khan et al., 2007; Kristiansen et al., 2001; Moreno et al., 2009; Sanchez-Torres et al., 2003; Schjetne et al., 2003; Van Gorp et al., 2008). Nosotros comprobamos que estos receptores son capaces de internalizar AcMos específicos para utilizarlos como vectores para dirigir el Ag. Utilizando macrófagos alveolares como célula diana demostramos que los tres receptores internalizaban los AcMos de manera eficaz ya que en 45 minutos una gran cantidad de los mismos se localizaba en el interior de dichas células. Sin embargo, aunque estos ensayos se realizaron en el mismo tipo celular y en las mismas condiciones, estos receptores presentaron una cinética de endocitosis diferente, siendo mucho más rápida a través del receptor CD163. Estas diferencias, posiblemente asociadas a características intrínsecas de los receptores, podrían ser relevantes en los procesos de captación y presentación antigénica ligados a cada uno de los mismos. Por otro lado, de manera indirecta, en los ensayos de linfoproliferación en los que hemos dirigido Ag *in vitro* a la Sn, el CD163 o el TLR2, también hemos demostrado que otros tipos celulares como los monocitos o las MoDCs son capaces de endocitar estos AcMos.

En estudios *in vitro* utilizando las CMSP procedentes de animales inmunizados con IgGs de ratón, observamos que cuando dirigíamos Ag a cualquiera de estos tres receptores empleando sus AcMo específicos como un sucedáneo de Ag, se precisaba una menor cantidad de Ag para conseguir los mismos niveles de linfoproliferación que cuando se utilizaba la Ig control. Cuando se estimularon las células con los AcMo anti-CD163 (2H12 y 2A10), se necesitaron entre 50 y 80 veces menos cantidad de estos anticuerpos que de la Ig control para obtener una respuesta proliferativa equivalente. Este no es el único receptor *scavenger* que ha sido estudiado como receptor al que dirigir Ag dada la habilidad de esta clase de moléculas

para reconocer e internalizar diferentes tipos de Ags. En ratón, al dirigir *in vitro* Ag al receptor CD36, la presentación de moléculas de ovalbúmina vía MHC-I y MHC-II fue 400 y 300 veces más eficiente respectivamente (Tagliani et al., 2008).

En el caso de la Sn, ya sea utilizando como APCs MoDCs o monocitos tratados con IFN α para inducir la expresión de esta molécula, se necesitaron cantidades 100 veces menores del AcMo anti-Sn que del AcMo control para alcanzar unos niveles similares de proliferación de células T. En humanos también se ha analizado *in vitro* el efecto de dirigir Ag a receptores que se expresan principalmente en la superficie de monocitos y macrófagos, como es el CD14. Este estudio se realizó utilizando como APCs monocitos o CMSP y como células respondedoras clones de linfocitos T específicos frente a Igs de ratón. Al dirigir el Ag a través de este receptor se necesitaron 1000 veces menos cantidad de cada uno de los tres AcMos anti-CD14 analizados que de la Ig control del mismo isotipo (Tunheim et al., 2005).

También hemos observado una mejora al dirigir el Ag al receptor TLR2 ya que, utilizando 25 veces menos cantidad de AcMo frente al mismo que de Ig control, la proliferación de las CMSP obtenida fue similar. Frente a este receptor también se han realizado estudios *in vitro* con células humanas utilizando un protocolo similar. En ese caso, empleando como APCs CMSP, monocitos, DCs inmaduras o DCs maduras, fueron necesarias cantidades entre 100 y 1000 veces menores del anticuerpo específico anti-TLR2 que de la Ig control para obtener respuestas linfoproliferativas similares (Schjetne et al., 2003). Probablemente, la mayor eficacia observada en el estudio realizado empleando células humanas sea consecuencia de que estos experimentos fueron realizados con un clon de células T específico frente a las Igs de ratón. Sin embargo, en nuestro trabajo, como células respondedoras utilizamos CMSP donde sólo una fracción de las mismas son capaces de responder frente al estímulo. Además, cabe señalar que en ninguno de los estudios, los AcMos empleados fueron capaces de activar a las APCs ya que no inducían la producción de TNF α (Alvarez et al., 2008; Schjetne et al., 2003), de tal manera que la mejora de la respuesta linfoproliferativa no parece ser debida a un efecto agonista de los AcMos empleados.

Los datos descritos anteriormente sugieren que los ligandos de estos tres receptores son procesados y que los péptidos que de ellos derivan

acceden a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad y se presentan a los linfocitos T.

A continuación evaluamos *in vivo* el potencial de estos AcMos para actuar como vectores, observándose un incremento de la respuesta inmune inducida al dirigir el Ag a cualquiera de los tres receptores estudiados. Este incremento fue menor cuando se dirigió el Ag al TLR2 que cuando los receptores diana fueron la Sn o el CD163. Cuando los animales fueron inmunizados con el AcMo anti-TLR2, durante las cuatro primeras semanas del ensayo se detectaron títulos de anticuerpos específicos frente a Igs de ratón en los sueros de dichos animales significativamente mayores que en los animales control. Sin embargo, no detectamos linfoproliferación Ag-específica de las CMSP procedentes de estos animales. El hecho de que se hayan detectado anticuerpos específicos en suero sugiere que en estos animales se ha desencadenado una cierta respuesta celular, aunque de magnitud insuficiente para ser detectada en un ensayo de linfoproliferación Ag-específico a partir de los precursores circulantes en sangre. Aunque el TLR2 puede transmitir señales a la APC que conducen a su activación y maduración (Hertz et al., 2001; Michelsen et al., 2001), el AcMo utilizado en nuestros estudios no parece ser agonista, por lo que carecería de esta capacidad (Alvarez et al., 2008). Por ello, en futuros estudios, podría ser interesante dirigir Ag *in vivo* al receptor TLR2 utilizando un AcMo con características agonistas o incorporar al AcMo 1H11 motivos agonistas. Así, en estudios *in vivo* realizados en ratón utilizando como vectores ligandos del TLR2 capaces de inducir la maduración de las DCs, se obtuvo una mejora en la respuesta inmune frente a diferentes Ags (Jackson et al., 2004; Prajeeth et al., 2010; Zhu et al., 2004). Al igual que se ha descrito para una gran variedad de receptores como Dectin-1 (Carter et al., 2006), DCIR2 (expresado en DC CD8 α ⁻) (Finkelman et al., 1996) o DEC-205 (expresado en DC CD8 α ⁺) (Boscardin et al., 2006; Corbett et al., 2005), podría ocurrir que al dirigir Ag al TLR2 utilizando el AcMo 1H11 también fuese necesaria la presencia de co-estímulos o adyuvantes. El fallo *in vivo* del AcMo anti-TLR2 también podría estar relacionado con una menor expresión de esta molécula, o del epítipo reconocido por este AcMo, en los órganos linfoides secundarios o con una menor accesibilidad de la misma en los tejidos respecto a las células en suspensión. En ese sentido, resultados

preliminares obtenidos mediante citometría de flujo a partir de suspensiones celulares de bazo y de ganglio linfático utilizando el mismo AcMo muestran la expresión de esta molécula en ambos tejidos, aunque a niveles bajos, mientras que en los estudios de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia apenas observamos marcaje en los ganglios linfáticos y en el bazo con el AcMo 1H11. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Tohno et al (2005) que, utilizando un suero policlonal, localizaron numerosas células TLR2⁺ en estos tejidos. No obstante, existe la posibilidad de que el suero policlonal utilizado en el trabajo anteriormente citado se una inespecíficamente a otras moléculas ya que, cuando realizaron estudios mediante citometría de flujo en suspensiones celulares procedentes de estos órganos, los porcentajes de células detectados fueron mucho menores (Tohno et al., 2005). Otra explicación podría ser que nuestro AcMo 1H11 reconociese un epítipo localizado sólo en uno de los heterodímeros TLR1/2 ó TLR6/2, que estuviera poco representado en las células de los órganos linfoides secundarios.

A diferencia de los animales inmunizados con el AcMo anti-TLR2, en aquellos animales inoculados con los AcMos anti-Sn o anti-CD163 se observó una marcada producción de anticuerpos específicos frente Igs de ratón en suero, aunque el tipo de respuesta generada fue diferente para cada uno de estos receptores. Además, las CMSP procedentes de los animales inmunizados con el AcMo anti-Sn mostraron una linfoproliferación específica superior a la detectada en las CMSP del grupo control.

Como se ha señalado anteriormente uno de los requisitos que debe cumplir un receptor al que dirigir Ag es que se exprese en células con capacidad de presentación antigénica. Cuando analizamos mediante inmunofluorescencia la co-expresión de Sn y CD163 en los ganglios linfáticos, observamos que las células Sn⁺ de los senos subcapsular y medular eran también positivas para CD163, mientras que en la periferia y en el interior de los folículos se detectaron células que sólo expresaban Sn. En el bazo, la expresión de estos marcadores estaba localizada en zonas diferentes, encontrándose las células Sn⁺ a ambos lados de la zona marginal y en los elipsoides y las CD163⁺ en la pulpa roja. La distribución de estos marcadores se asemeja a la descrita en el hombre y en el ratón (Berney et al., 1999; Crocker and Gordon, 1989; Hartnell et al., 2001; Kraal and Janse, 1986; Steiniger et al., 1997; Van den Heuvel et al., 1999).

Al analizar por inmunofluorescencia y por citometría de flujo la expresión en estas poblaciones celulares de moléculas asociadas a APCs, observamos que presentaban un fenotipo típico de macrófagos o de DCs y que constituían una población altamente heterogénea. La mayoría de estas células Sn^+ y/o CD163^+ expresaban CD172a , una molécula que se expresa en células de linaje mielomonocítico. Este marcador, además de en macrófagos, se expresa en DC porcinas (Summerfield et al., 2003). En los ganglios linfáticos la mayoría de las células $\text{CD163}^+\text{Sn}^+$ y $\text{CD163}^-\text{Sn}^+$ expresaban moléculas SLAII y CD80/86 . En el bazo, aunque a niveles menores, también se observó, la expresión de estos marcadores en las células CD163^+ y en las células Sn^+ . Por tanto, estos datos sugieren que dichas células podrían tener las características necesarias para su función como APCs. Respecto a la expresión de CD11R3 , CD16 y CD14 , todos ellos expresados en subpoblaciones de macrófagos, monocitos y DCs, hay que señalar que la expresión de los dos primeros fue mayor que la de CD14 y que con los tres marcadores se observó una expresión heterogénea en las subpoblaciones celulares estudiadas. El marcador CD11R1 ha sido empleado en la especie porcina para identificar DCs en varios tejidos linfoides (Bimczok et al., 2006). Nuestros resultados muestran que la expresión de CD11R1 se localiza mayoritariamente en las células $\text{CD163}^-\text{Sn}^+$ tanto en el bazo como en los ganglios linfáticos. Hay que señalar que en bazo humano, utilizando el marcador DEC-205 para identificar DCs, se ha descrito la localización de éstas células fundamentalmente en la región entre la pulpa roja y la pulpa blanca (Pack et al., 2008), zona donde nosotros hemos identificado las células $\text{CD163}^-\text{Sn}^+$. Sin embargo, en el trabajo de Pack et al, dichas DCs no expresaban Sn. Aunque, como se ha señalado en varias ocasiones, la expresión de Sn en los órganos linfoides secundarios porcinos se asemeja a la encontrada en células humanas, existen algunas discrepancias en la regulación de su expresión entre especies. Esto podría explicar la diferente distribución de esta molécula entre la especie humana y la porcina en las células anteriormente descritas. Por otro lado, las células $\text{CD163}^-\text{Sn}^+\text{CD11R1}^+$ de los ganglios linfáticos podrían estar relacionadas con las DCs Sn^+ descritas en ratón y, que al igual que ellas, se sitúan en la zona perifolicular y dentro de los folículos (Berney et al., 1999). Estos datos indican que la Sn podría expresarse en el cerdo en algunas células que presentan un fenotipo muy similar al de las DCs, a pesar de que la

expresión de dicha molécula ha sido asociada casi exclusivamente a macrófagos tisulares en la especie porcina entre otras. En este sentido, no existe ningún marcador exclusivo de DCs o de macrófagos y otros marcadores como el receptor de manosa, cuya expresión se había asociado a macrófagos tisulares, han sido detectados en DCs localizadas en tejidos linfoides en el ratón (McKenzie et al., 2007). Además, las células $CD163^-Sn^+$ muestran, tanto en bazo como en ganglio, una mayor heterogeneidad que las células $CD163^+$, por lo que consideramos interesante profundizar en futuros trabajos tanto en el estudio de su fenotipo como de su funcionalidad.

Mientras que las CMSP procedentes de los animales inmunizados con el AcMo anti-Sn mostraron una linfoproliferación específica frente a Igs de ratón, no se observaron diferencias significativas en esta respuesta en las CMSP de los cerdos inmunizados con los AcMos anti-CD163 respecto a la observada en los animales inmunizados con la Ig control. Esto podría deberse a la desigual distribución tisular de estos receptores en los órganos linfoides secundarios y en otros tejidos. Como se ha indicado previamente, las células Sn^+ , además de ubicarse en el SCS de los ganglios linfáticos (células $CD163^+Sn^+$) también aparecen en la zona marginal del bazo (células $CD163^-Sn^+$). La adecuada localización de estas células para llevar a cabo la captación de Ag y los mayores niveles de expresión de moléculas SLAII y CD80/86 que presentan en su superficie les podría permitir una mayor capacidad de presentación antigénica que a las células $CD163^+$. En el ratón, las células Sn^+ presentes en los ganglios linfáticos, en el bazo y en el hígado, son capaces de captar Ag y presentar péptidos derivados del mismo a las células T, induciendo su activación (Berney et al., 1999; Muerkoster et al., 1999; Umansky et al., 1996). Además, estudios recientes muestran que los macrófagos Sn^+ del bazo participan en la activación de las células T $CD8^+$ mediante la captación de Ag y su transferencia a las DCs localizadas en sus proximidades (Backer et al., 2010) y que los macrófagos Sn^+ de los ganglios linfáticos están implicados en la fagocitosis de células tumorales muertas y en la presentación cruzada de Ags tumorales a las células T $CD8^+$ (Asano et al., 2010). No obstante, teniendo en cuenta que, tanto en los animales inmunizados con el AcMo anti- Sn como con los AcMos anti-CD163 se observa una clara respuesta humoral frente a las Igs de ratón, parece evidente que se ha tenido que generar una respuesta T cooperadora *in vivo*

en ambos casos que no hemos podido detectar en nuestro ensayo de proliferación con las células procedentes de algunos animales inmunizados con los AcMos anti-CD163. Esto podría ser debido, como ya hemos comentado anteriormente para el AcMo anti-TLR2, a que la magnitud de la misma no es suficiente para permitir su detección a partir de precursores sanguíneos. También es posible que la activación de los linfocitos T a través de las moléculas CD163 y TLR2 sea más dependiente de la presencia de adyuvante que a través de la Sn. Aunque en algunos casos se genera una respuesta T efectiva dirigiendo antígeno a la superficie de APCs en ausencia de adyuvantes como el caso del CD36 (Tagliani et al., 2008), otros receptores como DEC-205 (Bonifaz et al., 2002; Bonifaz et al., 2004; Hawiger et al., 2001), Dectin-1 (Carter et al., 2006), Siglec-H (Zhang et al., 2006), DCIR2 (Dudziak et al., 2007; Soares et al., 2007), el receptor de manosa (He et al., 2007), CD11c o incluso MHC-II (Castro et al., 2008), requieren la presencia de señales de activación aportadas por diferentes adyuvantes para generar una respuesta inmune celular efectiva. De hecho, al igual que observamos en los animales inmunizados con AcMos específicos frente a CD163, cuando se dirige Ag a la molécula Clec9A en ausencia de adyuvante, se produce una mejora en la respuesta humoral pero no en la respuesta celular (Sancho et al., 2008). Cabe señalar que la dependencia de adyuvante para la generación de una respuesta humoral y celular adecuada, es en ocasiones una característica intrínseca del receptor y no del tipo celular. Así, cuando se dirige Ag *in vivo* a los receptores DEC-205 y CD36, ambos expresados en la misma subpoblación celular, CD36 es capaz de inducir la generación de células T efectoras en ausencia de señales de maduración, no obteniéndose ningún tipo de respuesta en las mismas condiciones en el caso del DEC-205 (Tagliani et al., 2008).

Respecto a la respuesta humoral, cuando dirigimos Ag *in vivo* a los receptores Sn y CD163 en ausencia de adyuvante, obtuvimos una respuesta fuerte y prolongada en el tiempo. Dos semanas después de la primera inmunización, en los sueros de los cerdos que habían sido inoculados con el AcMo anti-Sn o con los AcMos anti-CD163 comenzaban a detectarse mayores niveles de anticuerpos específicos frente Igs de ratón que en los sueros de los animales inmunizados con la Ig control. A la octava semana, los títulos de anticuerpos detectados en los cerdos inmunizados con el AcMo

anti-Sn fueron 60 veces mayores que los del grupo inmunizado con la Ig irrelevante. Cabe destacar que uno de los animales de este grupo experimental mostró un comportamiento anómalo con respecto a los animales del resto de los grupos, no detectándose anticuerpos en las muestras procedentes de este animal a lo largo de todo el ensayo. Al analizar los datos sin tener en cuenta a este animal, el incremento en los títulos de anticuerpos de los cerdos inmunizados con el AcMo anti-Sn fue 185 veces mayor que los del grupo control. Por otro lado desde la re-inmunización hasta la finalización del ensayo, en los animales inmunizados con los AcMos anti-CD163, la producción de anticuerpos específicos fue de 10 a 15 veces superior al detectado en los animales del grupo control. Esta mejora en la respuesta humoral puede ser debida al tipo de célula diana que reconocen nuestros AcMo en los ganglios linfáticos. En estos órganos las células CD163⁺Sn⁺ co-expresan en su mayoría el marcador CD172a, por lo que son presumiblemente macrófagos que se localizan en el SCS. En ratón, estos macrófagos Sn⁺ del SCS se han implicado en la captación de diferentes virus, Ags particulados e inmunocomplejos y en su presentación en condiciones nativas a las células B foliculares, iniciando de esta manera la respuesta humoral (Carrasco and Batista, 2007; Junt et al., 2007; Phan et al., 2007). Estos macrófagos son capaces de acceder al lumen de la zona subcapsular mediante prolongaciones y trasladar el Ag en su conformación nativa interaccionando con células B foliculares en la zona cortical (Carrasco and Batista, 2007; Junt et al., 2007; Phan et al., 2007). Estos linfocitos B *naïve* transportan el Ag a localizaciones más profundas del folículo y los transfieren a las células foliculares dendríticas (Ferguson et al., 2004; Phan et al., 2007), las cuales dejan expuesto en su superficie el Ag sin procesar, participando de esta manera en la maduración de la afinidad de los anticuerpos (Phan and Chtanova, 2010). Por lo tanto, al dirigir Ags a Sn y CD163 podríamos estar facilitando su captación por los macrófagos del SCS y de esta manera favoreciendo la iniciación de la respuesta inmune humoral frente a dichos Ags.

En el cerdo, la producción mayoritaria de anticuerpos de isotipos IgG₁ o IgG₂ se ha asociado con la inducción de respuestas T_H2 o T_H1 respectivamente (Crawley et al., 2003; Dawson et al., 2005). En los animales inmunizados con el AcMo anti-Sn se observó esencialmente la inducción de anticuerpos de isotipo IgG₁; si descartamos el animal no

respondedor inmunizado con este AcMo, el incremento de anticuerpos de este isotipo fue significativamente superior al detectado en los animales inmunizados con la Ig control cuatro semanas después de cada una de las inmunizaciones. Esta diferencia fue de hasta 70 veces en la décima semana del ensayo. Además, aunque en menor medida, se detectó cierta producción de anticuerpos de isotipo IgG₂ en estos animales. En el caso del CD163 se obtuvieron niveles de IgG₁ e IgG₂ significativamente superiores a los detectados en los sueros de los animales control, siendo los cambios más señalados en la producción de IgG₂. Este incremento en la respuesta humoral, entre 50 y 125 veces tras la segunda inmunización, se observa con ambos AcMo anti-CD163, independientemente de que éstos reconocen diferentes epítomos de la molécula, lo cual confirma que la mejora en la respuesta humoral no se debe a una peculiaridad del anticuerpo sino a las características del receptor o del tipo celular.

Tanto en la intensidad de la respuesta celular y humoral como en los isotipos mayoritarios que se producen, se observan diferencias en la respuesta inmune inducida cuando se dirige el Ag a la Sn, al CD163 o al TLR2. Diferentes factores pueden determinar la calidad y el tipo de respuesta que se genera, entre ellos las características intrínsecas del receptor al que se está dirigiendo el Ag. En ratón se ha observado que las diferentes vías de internalización de los receptores homólogos DEC-205 y MMR, consecuencia de las diferencias que existen en sus colas citoplasmáticas, conllevan cambios en la presentación antigénica. El primero se internaliza a través de endosomas tardíos o lisosomas, con gran cantidad de moléculas MHC-II asociadas a su membrana, y el segundo mediante endosomas tempranos, con mayor densidad de moléculas MHC-I (Mahnke et al., 2000). Otro de los factores determinantes en la intensidad y el tipo de respuesta inmune que se genera parece ser la subpoblación celular a la que se dirige el Ag. De hecho, en ratón, al dirigir Ag a la subpoblación de DC CD8 α ⁺ se promueve una respuesta tipo T_H1 y una producción de anticuerpos de isotipo IgG_{2a} mientras que, si el Ag es captado por la subpoblación de DC CD8 α ⁻, se desencadena una producción mixta de anticuerpos (IgG₁, IgG_{2a} e IgG_{2b}) y una respuesta T_H2 (Maldonado-Lopez et al., 1999; Pulendran et al., 1999; Soares et al., 2007). Además, existen diferencias entre poblaciones celulares en el tipo el tipo de proteasas y otras proteínas que intervienen en los procesos de procesamiento antigénico.

Estos factores, independientes del receptor al que se dirige el Ag, pueden también determinar la eficacia y la vía de presentación de dicho Ag. En experimentos en los que se dirigió Ag *in vivo* a DEC-205 humano expresado en DCs CD8 α^+ y CD8 α^- de ratones transgénicos se observó que solamente las DCs CD8 α^- fueron capaces de generar una respuesta mediada por MHC II. Esto muestra que la presentación por parte de estas células era independiente del tipo de receptor al que se dirige el Ag y se asoció, como se ha señalado anteriormente, a la diferente maquinaria de procesamiento antigénico existente en estas células (Dudziak et al., 2007). Del mismo modo, cuando se dirigió Ag a los receptores FIRE y CIRE en ratón en ausencia de adyuvante, ambos expresados en una subpoblación de DCs CD8 α^- , se obtuvo una producción de anticuerpos 100 veces superior a la del grupo control y el mismo tipo de respuesta con ambos anticuerpos. Sin embargo, la inmunización de los animales con una AcMo anti-DEC205 dirigido a la subpoblación DCs CD8 α^+ , en ausencia de señales de maduración, no fue capaz de desencadenar una respuesta humoral más eficaz que la obtenida en el grupo control (Corbett et al., 2005). Por lo tanto, el balance de la respuesta T_H1/T_H2, el procesamiento de Ag vía moléculas MHC I o MHC II o la eficacia obtenida al dirigir Ag a un receptor parece estar determinada, no sólo por las diferencias entre los receptores a los que se dirige el Ag, sino también por la propiedades intrínsecas de la APC. Todo ello podría explicar las diferencias observadas en la intensidad y el perfil de anticuerpos producidos en los animales inmunizados con nuestros AcMos.

El empleo de AcMos como vectores vacunales presenta varios problemas que pueden disminuir su efectividad tales como su alta inmunogenicidad o su bajo aclaramiento sanguíneo debido al tamaño de la molécula de Ig; también cabe destacar la dificultad técnica asociada a la generación de las moléculas de fusión Ig-Ag o la imposibilidad de utilizar estas construcciones en forma de vacuna de DNA. Frente a esta situación se han desarrollado moléculas recombinantes que, manteniendo la especificidad de los AcMos parentales, no presentan dichas desventajas. Entre estas moléculas se encuentran los fragmentos scFv, formados por las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del AcMo unidas por un péptido de longitud variable. Estas moléculas son menos inmunogénicas que las Igs debido a que carecen del fragmento Fc (Kim et al., 2002;

Pavlinkova et al., 1999), tienen un menor tamaño, pueden ser fusionadas fácilmente a diferentes Ags mediante técnicas habituales de Biología Molecular y ser empleadas como vacuna de DNA.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos *in vivo* utilizando AcMos específicos frente a los receptores CD163 y Sn, decidimos generar fragmentos scFv a partir de estos AcMos como vectores para dirigir Ag a las APCs en forma de vacuna de DNA. Como Ag modelo seleccionamos la nucleoproteína del virus del SRRP ya que disponíamos de las herramientas necesarias para estudiar la respuesta inmune específica generada frente a la misma. Existen *kits* comerciales para detectar la producción de anticuerpos específicos en suero y en el laboratorio teníamos plásmidos que codificaban dicha proteína, lo que nos ha facilitado la obtención de las moléculas de fusión scFv-Proteína N y la producción de las mismas.

Los scFv generados en este trabajo mantienen la especificidad y capacidad de unión a su receptor. Fusionados a GFP o a la proteína N hemos comprobado que dichas proteínas se unían a los macrófagos alveolares y que dicha unión podía ser bloqueada por los AcMos parentales y no por AcMos específicos frente a otros receptores expresados en esas células. Además, estas moléculas recombinantes mostraban el patrón de reactividad esperado en órganos linfoides secundarios cuando se analizaban mediante inmunohistoquímica. En este sentido, estos scFv representan una nueva herramienta que puede ser utilizada como sustituto de los AcMos parentales de los que proceden, ya que la ausencia del fragmento Fc puede reducir las uniones indeseadas (Peipp et al., 2004) y la posibilidad de expresarlos en fase con una proteína fluorescente evita el riesgo de alteración que puede producirse al realizar la unión del fluorocromo al AcMo o al Fab mediante métodos químicos (Reimann et al., 1994).

La intensidad de marcaje obtenida por citometría de flujo con los scFv fue menor que con los AcMos (Revilla et al., 2009; Sanchez et al., 1999). Esto parecía deberse a la baja cantidad de proteína recombinante presente en los sobrenadantes de cultivo procedentes de las células CHO transfectadas de manera estable con los plásmidos que las codifican. Aunque no disponíamos de un sistema de cuantificación de la cantidad de proteína recombinante presente en cada uno de los sobrenadantes de cultivo, fue necesario concentrar dichos sobrenadantes hasta 50 veces para poder detectar la unión de estas moléculas a sus receptores mediante

citometría de flujo e inmunohistoquímica. Se ha descrito que utilizando otros tipos celulares y sistemas de producción de proteínas recombinantes como bacterias (hasta 1 g/l), levaduras (hasta 200 mg/l), hongos (hasta 10-50 mg/l) o células de insecto (hasta 30 mg/l), se pueden obtener mejores rendimientos que empleando células de mamífero (revisado por Schirrmann et al., 2008). Sin embargo, elegimos como sistema de producción de proteínas las células de mamífero ya que presentan las chaperonas adecuadas implicadas en la formación de anticuerpos que facilitan el correcto plegamiento de los scFv (Melnick et al., 1994). Además, los sistemas de producción alternativos anteriormente mencionados pueden presentar algunas complicaciones. Por ejemplo, en el caso de las células de insecto la obtención de líneas celulares estables resulta más complejo que en el caso de células de mamífero (Schirrmann et al., 2008), y en bacterias requiere el transporte de dichas proteínas al periplasma donde existe el ambiente oxidante necesario para que se formen los puentes disulfuro y se produzca el plegamiento adecuado de dichas proteínas (Owen et al., 1992).

Otro factor que también puede afectar a la capacidad de unión de los scFv a sus receptores y, por lo tanto, a la intensidad de fluorescencia observada en los experimentos de citometría de flujo es el orden en el que aparecen clonados los fragmentos V_H y V_L . En los scFv generados en este trabajo, la secuencia que codifica el dominio variable de la cadena pesada aparece clonado delante la secuencia que codifica el dominio variable de la cadena ligera (V_H - V_L). Tunheim et al (2007) compararon la capacidad de unión de dos proteínas recombinantes que contenían scFv específicos frente a TLR2 diseñados con la región variable de la cadena pesada antes que la región variable de la cadena ligera y viceversa, observando que los scFv cuyos segmentos variables aparecen en el orden V_H - V_L presentaban mayor capacidad de unión al receptor TLR2 expresado en células CHO (Tunheim et al., 2007). Sin embargo, otros autores han observado que, cuando la longitud del péptido de unión es menor de 25 aminoácidos, en nuestro caso 15 aminoácidos, la construcción scFv V_L - V_H presenta una capacidad de unión mayor (Anand et al., 1991; Buchner et al., 1992; Luo et al., 1995).

Finalmente, las características monoméricas de estas proteínas también pueden afectar a su afinidad, disminuyendo la interacción con su receptor y, por lo tanto, la intensidad de fluorescencia.

Como se ha discutido previamente, una de las características que tiene que cumplir un vector para que sea efectivo para dirigir Ag a las APCs es que sea internalizado tras su unión al receptor. Los scFv frente a los receptores Sn y CD163 fueron endocitados eficientemente por los macrófagos alveolares. Además, estos experimentos de endocitosis sugieren que los scFv generados en este trabajo son estructuras estables que mantienen su capacidad de unión a 37°C, lo cual no siempre sucede con este tipo de construcciones, que en ocasiones tienden a desnaturalizarse o agregarse. Uno de los motivos que pueden ser determinantes para esta estabilidad es el número de residuos que aparecen en el péptido de unión. En nuestro caso, el péptido de unión consta de 15 aminoácidos, habiéndose descrito que los monómeros scFv con péptidos de unión formados por 15-20 aminoácidos son termodinámicamente los más estables, mientras que los *diabodies* o dímeros de scFv que se generan cuando se utilizan péptidos de unión de pequeño tamaño (5 aminoácidos) son más inestables y los scFv que presentan péptidos de unión con tamaños intermedios muestran una mayor o menor estabilidad según su equilibrio monómero-dímero (Worn and Pluckthun, 2001).

Una vez comprobadas la reactividad, especificidad y estabilidad de nuestras proteínas recombinantes, evaluamos el potencial de la construcción scFv anti-Sn-Proteína N para ser utilizada en forma de vacuna de DNA, ya que con su AcMo parental fue con el que se obtuvo la mejor respuesta humoral y celular.

La vacunación con DNA presenta ventajas con respecto al uso de vacunas proteicas ya que es un sistema de inmunización mucho más económico, más sencillo de producir y menos dependiente de la cadena de frío. También es destacable la gran flexibilidad del sistema, ya que pueden generarse proteínas recombinantes unidas a diferentes Ags de manera sencilla utilizando técnicas habituales de Biología Molecular. Además, se ha demostrado que estas vacunas son buenas inductoras de citotoxicidad (revisado en Sharma and Khuller, 2001)), lo cual es importante en nuestro caso teniendo en cuenta que muchos de los patógenos que infectan a la especie porcina son intracelulares. Sin embargo, uno de los principales problemas del uso de vacunas de DNA en animales de gran tamaño, es que son menos eficaces que en animales de experimentación como el ratón. Por

ello es importante el desarrollo de estrategias que permitan optimizar la eficacia de este tipo de vacunas entre las que podríamos incluir la dirección del Ag a receptores expresados en la superficie de APCs, con objeto de mejorar la captación y presentación Ag a los linfocitos. Aproximadamente el 95-99% del plásmido que se inocula en el músculo se degrada (Barry et al., 1999) y sólo un 0,1% del plásmido que llega al citoplasma entra en el núcleo de la células (Lechardeur et al., 1999), por lo que podrían producirse pequeñas cantidades de proteína y sería necesario optimizar su captura. Barfoed et al (2004) realizaron estudios de vacunación con plásmidos que codificaban cada ORF del virus del SRRP sin utilizar ninguna estrategia para la mejora de la respuesta inmune. En estos experimentos se necesitaron al menos cuatro inmunizaciones, cada una de las cuales constaba de 4 dosis de plásmido en el tórax y 4 dosis en la oreja mediante *gen gun*, para detectar cierta producción de anticuerpos específicos en el grupo inmunizado con ORF7, y hasta 6 inmunizaciones en los grupos inmunizados con ORF4 y ORF6 (Barfoed et al., 2004).

En nuestro caso, como habíamos comprobado que dirigir Ag a la molécula de Sn mejoraba tanto la respuesta celular como humoral, inmunizamos grupos de cerdos con los plásmidos que codificaban la proteína N, las proteínas recombinantes scFv control y scFv anti-Sn unidas a ésta o con el plásmido vacío y estudiamos la respuesta Ag-específica en estos animales. Tras tres dosis de plásmido, los animales recibieron una dosis de vacuna inactivada frente virus del SRRP. Se empleó una pauta de inmunización heteróloga DNA/vacuna inactivada ya que se ha descrito que este tipo de inmunizaciones son más efectivas (revisado en Lu, 2009). La inmunización se realizó por vía intramuscular, ya que ésta es una de las rutas más efectiva para la expresión de genes (Wolff et al., 1990) y la estimulación de la respuesta inmune (Ulmer et al., 1993).

Cuando se analizó la respuesta humoral tras la inmunización de los animales con los diferentes plásmidos, los mayores niveles de producción de anticuerpos específicos frente a la proteína N se detectaron tras el pseudo-desafío ya que con tres dosis de DNA sólo se observó una ligera producción de anticuerpos frente a la proteína N en dos animales del grupo inmunizado con el scFv 1D9 ORF7 y en dos animales del grupo inmunizado con scFv 3B11 ORF7. Estos resultados estarían en consonancia con otros estudios que muestran que la vacunación con DNA no induce altos niveles de

anticuerpos pero es un procedimiento que prima eficientemente el sistema inmune, disparándose la respuesta cuando se realiza una re-inmunización con proteína. Así, la respuesta de anticuerpos neutralizantes inducida en conejos mediante la inoculación de tres o cuatro dosis con un plásmido que codificaba la proteína Env o la proteína gp120 del virus del HIV-1 respectivamente se vio mejorada en título, persistencia y actividad neutralizante cuando los conejos recibieron una re-inmunización con la proteína correspondiente (Richmond et al., 1998; Wang et al., 2005).

Los animales inmunizados con el plásmido que codifica el scFv anti-Sn unido a Proteína N, presentaban una respuesta humoral más intensa y temprana que la desencadenada en los animales del resto de los grupos. Por tanto, el empleo del scFv anti-Sn para dirigir el Ag a las APCs es un método eficaz para mejorar la respuesta humoral en un modelo de vacunación con DNA. Así mismo, la combinación de inmunizaciones con plásmidos que codifican la nucleoproteína con la vacuna inactivada mejoró la respuesta humoral inducida frente a dicha proteína con respecto al uso de la vacuna sola. Muchas de las vacunas que actualmente existen en el mercado, tanto para su uso en Sanidad animal como humana, necesitan varias rondas de inmunización para ser eficaces (revisado en Lu, 2009). La vacuna inactivada frente al virus del SRRP que hemos empleado en nuestros estudios es una de ellas. Existen otros trabajos en los que se muestra un aumento en la eficacia de vacunas comercializadas frente a determinados patógenos al combinar el uso de DNA y vacunas basadas en virus inactivados en las reinmunizaciones. Así, se ha conseguido mejorar la eficacia de la vacuna de DNA frente a la rabia (DRV) inmunizando posteriormente a los ratones con dosis bajas de virus inactivado. Con esta pauta de inmunización se consiguió aumentar en más de 600 veces los títulos de anticuerpos neutralizantes obtenidos al administrar sólo la vacuna de DNA, y se indujo protección frente al desafío con el virus (Biswas et al., 2001). De la misma manera, se obtuvo una mejor respuesta con la vacuna inactivada trivalente (TIV) frente al virus de la gripe cuando se inmunizaron los conejos previamente con el DNA que codifica las hemagglutininas H1 y H3, induciéndose una respuesta más eficaz siguiendo esta protocolo de inmunización que cuando se realizaron dos inmunizaciones sólo con la vacuna o sólo con el DNA (Wang et al., 2008). De hecho, como objetivo de futuros estudios, sería interesante comprobar si la mejora en la respuesta

inmune conseguida al dirigir Ag a la molécula de Sn permitiría reducir el número de dosis o la cantidad de plásmido.

Cuando se estudió la linfoproliferación específica frente al virus, la magnitud de la respuesta celular no fue suficiente para permitir su detección en CMSP. La incapacidad de inducir en ocasiones inmunidad humoral y celular simultáneamente es uno de los principales problemas de las vacunas de DNA (revisado en Dhama et al., 2008), lo cual ya ha sido observado con otras vacunas de DNA frente al virus del SRRP (Rompato et al., 2006; Xue et al., 2004). Quizá, si los animales hubieran sido desafiados con el virus, lo cual fue imposible debido a las características de nuestras instalaciones, los niveles de linfoproliferación y de producción de anticuerpos habrían sido mucho mayores, como ya se ha observado en otros estudios *in vivo* con este virus (Rompato et al., 2006). De hecho la producción de anticuerpos específicos puede llegar a aumentar 100 veces después de la infección en animales que previamente habían sido inmunizados con el plásmido que codifica la proteína N del virus del SRRP (Barfoed et al., 2004). En cualquier caso, el hecho de que los niveles de linfoproliferación y de producción de anticuerpos específicos frente al Ag sean mucho menores cuando inmunizamos con DNA que con proteína no es sorprendente. Uno de los factores que podría determinar estas diferencias es que, como se ha señalado anteriormente, la mayor parte del plásmido que se inocula es degradado en el músculo (Barry et al., 1999), por lo que la cantidad de proteína que se traduce se estima que es del orden del ng. Por el contrario, en los experimentos en los que inmunizamos cerdos con los AcMos específicos de los receptores, empleamos 1mg de proteína por dosis. Aunque en este caso es de suponer que también existe una degradación de la proteína, observamos su presencia claramente en órganos linfoides secundarios (datos no mostrados). Estas diferencias en la respuesta obtenida empleando DNA o proteína como vectores vacunales también se han observado en ratón cuando se dirigió la ovoalbúmina al receptor endocítico DEC-205. En este caso, la respuesta celular medida como células productoras de IFN- γ mediante ELISPOT fue 1000 veces superior cuando se inmunizaron los ratones con el AcMo anti-DEC 205 fusionado a ovalbúmina con respecto al grupo inmunizado con ovalbúmina, ambos en presencia del AcMo anti-CD40. Sin embargo, en un modelo de inmunización con DNA, empleando como vector un scFv derivado del mismo AcMo anti-DEC 205

fusionado a la proteína Ag85B de *Mycobacterium tuberculosis*, el incremento observado en el número de células productoras de IFN- γ fue solamente 10 veces superior al obtenido en los ratones inmunizados únicamente con el plásmido que codificaba la proteína Ag85B. Cabe señalar que, en el experimento en el que se empleó el scFv anti-DEC 205 unido a Ag85B en forma de vacuna de DNA, no se realizó la co-inmunización con AcMo-anti-CD40, ni con ningún otro adyuvante (Demangel et al., 2005). En ese mismo trabajo se observó un incremento de la respuesta humoral de aproximadamente 10 veces en los ratones en los que se dirigió el Ag85B a DEC 205 comparado con los animales control (Demangel et al., 2005). Así mismo, se observó un incremento de 10 veces el número de células productoras de IFN- γ en ratones inmunizados con un plásmido que codificaba el mismo scFv anti-DEC 205 fusionado a la proteína gap p41 del HIV-1 con respecto a los animales inmunizados con el plásmido que codificaba la proteína sola (Nchinda et al., 2008). Las diferencias descritas anteriormente en la magnitud de la respuesta inmune inducida cuando se utilizan como vectores scFv y se inmuniza con DNA o cuando se emplean AcMos y se inmuniza con proteína serían comparables a los observados en nuestro trabajo. En nuestro caso, hemos observado títulos mayores de anticuerpos empleando el AcMo anti-Sn que cuando inmunizamos a los cerdos con un plásmido que codifica el scFv anti-Sn fusionado a la Proteína N. Además, en el primer caso, fuimos capaces de detectar proliferación Ag-específica de las CMPS mientras que no se observó dicha proliferación en los animales inmunizados con el plásmido que codifica el scFv anti-Sn fusionado a la Proteína N. Hay que destacar que en nuestros experimentos no hemos empleado ningún tipo de adyuvante; esto abre la posibilidad de co-administrar la construcción que codifica el scFv anti-Sn con CpGs u otros plásmidos que codifiquen IFN α (para aumentar la expresión de dicha molécula en APCs), u otras citoquinas que se han descrito que pueden actuar como adyuvantes y mejorar la respuesta en el modelo porcino (revisado en van Drunen Littel-van den Hurk et al., 2004).

Otro factor que también puede afectar a la menor eficacia para inducir una respuesta inmune de los scFv con respecto a los AcMos es el hecho de que estas proteínas recombinantes son monovalentes, aunque nuestros resultados no muestran grandes diferencias entre las cinéticas de encoditosis de los AcMos y los scFv. Por otra parte, como se señaló

anteriormente también se ha descrito que el orden en el que aparezcan clonadas las secuencias variables de la cadena pesada y ligera que forman el scFv puede determinar la afinidad de éste por su receptor y, en consecuencia, su eficiencia como vector para dirigir Ag a la APCs (Tunheim et al., 2007). En este sentido, se observaron diferencias cuando se realizaron ensayos de linfoproliferación *in vitro* de clones de células T humanas entre scFv anti-TLR2, utilizados como vectores de Ag, cuyas regiones aparecían en el orden V_H-V_L o V_L-V_H (Tunheim et al., 2007).

Por otro lado, también se ha demostrado que la ruta de inmunización influye en la respuesta inmune que se genera. Nosotros realizamos una inmunización intramuscular, ya que es el protocolo más común empleado con las vacunas de DNA (revisado en Faurez et al., 2010). Otra de las rutas de inmunización que induce una buena respuesta tanto humoral como celular con esta clase de vacunas es la ruta intradérmica (Kunzi et al., 2009; Sugimura et al., 2008; van Rooij et al., 1998). Debido a que no fuimos capaces de detectar la expresión de Sn en piel, consideramos que la ruta muscular era más adecuada para los experimentos en los que empleamos el scFv anti-Sn unido a Proteína N. Sin embargo, para futuros estudios en los que evaluaremos el potencial como vector del scFv anti-CD163 para dirigir Ag a APCs, la ruta intradérmica puede ser más adecuada que la intramuscular ya que recientemente se ha descrito la presencia de DCs CD163⁺ localizadas en la dermis del cerdo (Marquet et al., 2011).

Otro aspecto a considerar en el empleo de los scFv como vectores para dirigir el Ag en combinación con una vacuna inactivada frente al virus del SRRP u otro tipo de patógeno es la posibilidad de modular las características de la respuesta inducida por la vacuna. Como hemos mostrado, la respuesta humoral inducida al dirigir Ag a la Sn o al CD163 mediante el empleo de AcMos específicos fue principalmente de isotipo IgG₁ o IgG₂ respectivamente.

Aparte del interés como especie ganadera, el cerdo representa un buen modelo biomédico. Los avances en el desarrollo de estrategias más eficientes de inmunización con DNA en esta especie podrían ser trasladadas a la especie humana, por lo que conviene destacar la relevancia de la Sn y el CD163 como receptores diana a los que dirigir Ag. Como se ha comentado previamente, la Sn y el CD163 tienen una distribución muy

similar en cerdo y en humano a nivel de poblaciones celulares (Buechler et al., 2000; Chamorro et al., 2000; Gronlund et al., 2000; Hartnell et al., 2001; Kirchberger et al., 2005; Maniecki et al., 2006; Sanchez et al., 1999; Sulahian et al., 2000; Van den Heuvel et al., 1999) y en los órganos linfoides secundarios (Hartnell et al., 2001; Steiniger et al., 1997; Van den Heuvel et al., 1999). También existe una gran homología entre sus secuencias proteicas, un 80% de homología entre la Sn humana (Referencia del NCBI: AAK00757.1) y porcina (Referencia del NCBI: NP_999511.1) y un 85% de homología entre el CD163 humano (Referencia del NCBI: Q86VB7.2) y porcino (Referencia del NCBI: AJ311716; (Pérez et al., 2008)). Además, se aprecian grandes similitudes en la estructura de la piel entre ambas especies (Hammond et al., 2000; Vardaxis et al., 1997), confirmadas a nivel de las subpoblaciones celulares presentes en este tejido (Klechevsky et al., 2008; Marquet et al., 2011; Ochoa et al., 2008). Una de estas subpoblaciones, las DCs dérmicas porcinas CD163^{hi} CD172a⁺, ha sido relacionada con una subpoblación celular de la dermis humana caracterizada como CD14⁺CD163⁺, especializada en primar a células T CD4⁺ e inducir a activación de los linfocitos B hacia células productoras de anticuerpos (Klechevsky et al., 2008). Estos resultados están en consonancia con las observaciones realizadas *in vivo* en el modelo de ratón, donde se observan DCs dérmicas cerca de los folículos o zonas B en el exterior del paracortex del ganglio linfático (Kissenpfennig et al., 2005). Por todo esto cobra relevancia realizar los estudios de inmunización con el DNA que codifica el scFv anti-CD163 unido a la nucleoproteína del vSRRP vía intradérmica, y comprobar si dirigir Ag a estas DCs dérmicas presentes en ambas especie podría mejorar la respuesta inmune de los animales. Los prometedores datos obtenidos en nuestros estudios *in vitro* e *in vivo* utilizando dos AcMos frente a diferentes epítomos de este receptor, la versatilidad del sistema para sustituir de manera sencilla el Ag frente al que se quiere generar una respuesta inmune adecuada y el hecho de que el AcMo 2A10, del que deriva el scFv, es capaz de reconocer la molécula CD163 humana (Dr. Ángel Corbí, comunicación personal), convierten a esta construcción en una herramienta prometedora en la mejora de vacunas DNA.

Por todo ello, consideramos que los resultados mostrados en esta tesis aportan datos y herramientas que podrían ser de gran interés para el diseño de vacunas de nueva generación más eficaces tanto en Sanidad animal como humana.

CONCLUSIONES

1. La sialoadhesina (Sn) porcina se expresa en células dendríticas derivadas de monocitos y en macrófagos alveolares; los monocitos, granulocitos y linfocitos son negativos para esta molécula. Los monocitos adquieren la expresión de Sn cuando son incubados en presencia de IFN α o de suero de cerdo.

2. En los órganos linfoides secundarios, la sialoadhesina se expresa en células localizadas en zonas anatómicamente apropiadas para capturar antígenos. En el bazo se expresa en células localizadas en la zona marginal, entre la pulpa blanca y la pulpa roja, y en las paredes de los vasos elipsoidales. En los ganglios linfáticos, las células que expresan sialoadhesina se distribuyen en los senos subcapsular y medular, y en la periferia y en el interior de los folículos.

3. Las células CD163⁺ aparecen localizadas en el seno subcapsular de los ganglios linfáticos y co-expresan sialoadhesina. En el bazo esta molécula muestra un patrón de expresión diferente a la sialoadhesina, detectándose las células CD163⁺ en la pulpa roja.

4. Las células CD163⁺Sn⁺ y CD163⁻Sn⁺ del ganglio linfático y CD163⁺Sn⁻ y CD163⁻Sn⁺ del bazo poseen características fenotípicas compatibles con una función de célula presentadora de antígeno, expresando mayoritariamente CD172a, SLAII y CD80/86. La expresión de marcador CD11R1, asociado a DCs, se localiza en ambos órganos linfoides mayoritariamente en las células CD163⁻Sn⁺, que también expresan altos niveles de moléculas SLA II.

5. Los receptores sialoadhesina, CD163 y TLR2 median la endocitosis de los AcMos dirigidos frente a ellos de manera rápida y eficaz en macrófagos alveolares. Los monocitos y las MoDCs son capaces de inducir la proliferación de linfocitos T específicos de Ig de ratón por lo que también endocitan y procesan estos AcMos.

6. La dirección de Ags *in vitro* a los receptores sialoadhesina, CD163 y TLR2 mejora la captura y presentación de los mismos requiriéndose cantidades entre 25 y 100 veces menores de los AcMos frente a estos

receptores que de una Ig control para obtener niveles similares de linfoproliferación.

7. La dirección de Ags *in vivo* a los receptores sialoadhesina, CD163 y TLR2 mejora la respuesta humoral. Los animales inmunizados con los AcMos 3B11 (anti-Sn), 2A10 (anti-CD163), 2H12 (anti-CD163) y 1H11 (anti-TLR2) presentaron niveles séricos de IgGs específicas frente a Igs de ratón significativamente superiores a los detectados en los sueros de los animales inmunizados con una Ig control.

8. La dirección *in vivo* de Ag a los receptores sialoadhesina y TLR2 indujo mayoritariamente la producción de Igs de isotipo IgG₁, mientras que la dirección a CD163 favoreció la producción de IgG₂.

9. Las células mononucleares sanguíneas procedentes de los animales inmunizados con el AcMo anti-sialoadhesina mostraron una linfoproliferación Ag-específica significativamente superior a la detectada en el grupo control. También se detectó proliferación en las células mononucleares sanguíneas de algunos animales inmunizados con el AcMo anti-CD163, aunque no se observaron diferencias significativas con respecto al grupo control.

10. Las proteínas recombinantes scFv específicas de los receptores Sn y CD163, fusionadas a GFP o a la proteína N del virus del SRRP, son moléculas estructuralmente estables que mantienen la especificidad y la capacidad de unión a su receptor y posterior internalización. Estos fragmentos representan una nueva herramienta que puede ser utilizada como sustituto de los AcMos parentales de los que proceden.

11. Cuando se inmunizaron animales con el plásmido que codifica el scFv anti-sialoadhesina unido a la proteína N del virus del SRRP, seguido de una reinmunización con una vacuna inactivada, se obtuvo una respuesta humoral específica más intensa y temprana respecto a la obtenida en los animales inmunizados con el plásmido que codifica la Proteína N, el scFv control Proteína N o sólo con la vacuna.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A.K.**, Lichtman, A.H., and Pober, J.S. (1999). *Inmunología celular y molecular*. Madrid: Ed. Interamericana-McGraw Hill *Tercera edición*.
- Alvarez, B.**, Revilla, C., Domenech, N., Perez, C., Martinez, P., Alonso, F., Ezquerra, A., and Domínguez, J. (2008). Expression of toll-like receptor 2 (TLR2) in porcine leukocyte subsets and tissues. *Vet Res* 39, 13.
- Alvarez, B.**, Sanchez, C., Bullido, R., Marina, A., Lunney, J., Alonso, F., Ezquerra, A., and Domínguez, J. (2000). A porcine cell surface receptor identified by monoclonal antibodies to SWC3 is a member of the signal regulatory protein family and associates with protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *Tissue Antigens* 55, 342-351.
- Allan, R.S.**, Smith, C.M., Belz, G.T., van Lint, A.L., Wakim, L.M., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2003). Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science (New York, N.Y)* 301, 1925-1928.
- Allan, R.S.**, Waithman, J., Bedoui, S., Jones, C.M., Villadangos, J.A., Zhan, Y., Lew, A.M., Shortman, K., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2006). Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. *Immunity* 25, 153-162.
- Allen, C.D.**, Okada, T., and Cyster, J.G. (2007a). Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 27, 190-202.
- Allen, C.D.**, Okada, T., Tang, H.L., and Cyster, J.G. (2007b). Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science (New York, N.Y)* 315, 528-531.
- Anand, N.N.**, Mandal, S., MacKenzie, C.R., Sadowska, J., Sigurskjold, B., Young, N.M., Bundle, D.R., and Narang, S.A. (1991). Bacterial expression and secretion of various single-chain Fv genes encoding proteins specific for a Salmonella serotype B O-antigen. *The Journal of biological chemistry* 266, 21874-21879.
- Andrew, M.**, Morris, K., Coupar, B., Sproat, K., Oke, P., Bruce, M., Broadway, M., Morrissy, C., and Strom, D. (2006). Porcine interleukin-3 enhances DNA vaccination against classical swine fever. *Vaccine* 24, 3241-3247.
- Andrew, M.E.**, Morrissy, C.J., Lenghaus, C., Oke, P.G., Sproat, K.W., Hodgson, A.L., Johnson, M.A., and Coupar, B.E. (2000). Protection of pigs against classical swine fever with DNA-delivered gp55. *Vaccine* 18, 1932-1938.
- Apostolopoulos, V.**, Barnes, N., Pietersz, G.A., and McKenzie, I.F. (2000). Ex vivo targeting of the macrophage mannose receptor generates anti-tumor CTL responses. *Vaccine* 18, 3174-3184.
- Asano, K.**, Nabeyama, A., Miyake, Y., Qiu, C.H., Kurita, A., Tomura, M., Kanagawa, O., Fujii, S., and Tanaka, M. (2010). CD169-positive macrophages dominate antitumor immunity by crosspresenting dead cell-associated antigens. *Immunity* 34, 85-95.
- Backer, R.**, Schwandt, T., Greuter, M., Oosting, M., Jungerkes, F., Tuting, T., Boon, L., O'Toole, T., Kraal, G., Limmer, A., and den Haan, J.M. (2010). Effective collaboration between marginal metallophilic macrophages and CD8+ dendritic cells in the generation of cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 216-221.
- Banchereau, J.**, Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-811.
- Banchereau, J.**, and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

- Barbalat, R.**, Lau, L., Locksley, R.M., and Barton, G.M. (2009). Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nat Immunol* 10, 1200-1207.
- Barfoed, A.M.**, Blixenkrone-Moller, M., Jensen, M.H., Botner, A., and Kamstrup, S. (2004). DNA vaccination of pigs with open reading frame 1-7 of PRRS virus. *Vaccine* 22, 3628-3641.
- Barouch, D.H.**, Santra, S., Schmitz, J.E., Kuroda, M.J., Fu, T.M., Wagner, W., Bilska, M., Craiu, A., Zheng, X.X., Krivulka, G.R., *et al.* (2000). Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. *Science* (New York, N.Y. 290, 486-492.
- Barouch, D.H.**, Yang, Z.Y., Kong, W.P., Koriath-Schmitz, B., Sumida, S.M., Truitt, D.M., Kishko, M.G., Arthur, J.C., Miura, A., Mascola, J.R., *et al.* (2005). A human T-cell leukemia virus type 1 regulatory element enhances the immunogenicity of human immunodeficiency virus type 1 DNA vaccines in mice and nonhuman primates. *J Virol* 79, 8828-8834.
- Barral, P.**, Polzella, P., Bruckbauer, A., van Rooijen, N., Besra, G.S., Cerundolo, V., and Batista, F.D. (2010). CD169(+) macrophages present lipid antigens to mediate early activation of iNKT cells in lymph nodes. *Nat Immunol* 11, 303-312.
- Barry, M.E.**, Pinto-Gonzalez, D., Orson, F.M., McKenzie, G.J., Petry, G.R., and Barry, M.A. (1999). Role of endogenous endonucleases and tissue site in transfection and CpG-mediated immune activation after naked DNA injection. *Hum Gene Ther* 10, 2461-2480.
- Bartoli, C.**, Civatte, M., Pellissier, J.F., and Figarella-Branger, D. (2001). CCR2A and CCR2B, the two isoforms of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor are up-regulated and expressed by different cell subsets in idiopathic inflammatory myopathies. *Acta Neuropathol* 102, 385-392.
- Bautista, E.M.**, and Molitor, T.W. (1997). Cell-mediated immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine. *Viral Immunol* 10, 83-94.
- Bautista, E.M.**, Suarez, P., and Molitor, T.W. (1999). T cell responses to the structural polypeptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Archives of virology* 144, 117-134.
- Beard, C.**, Ward, G., Rieder, E., Chinsangaram, J., Grubman, M.J., and Mason, P.W. (1999). Development of DNA vaccines for foot-and-mouth disease, evaluation of vaccines encoding replicating and non-replicating nucleic acids in swine. *J Biotechnol* 73, 243-249.
- Benvenisti, L.**, Rogel, A., Kuznetzova, L., Bujanover, S., Becker, Y., and Stram, Y. (2001). Gene gun-mediate DNA vaccination against foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 19, 3885-3895.
- Berek, C.**, Berger, A., and Apel, M. (1991). Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* 67, 1121-1129.
- Bergtold, A.**, Desai, D.D., Gavhane, A., and Clynes, R. (2005). Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. *Immunity* 23, 503-514.
- Berney, C.**, Herren, S., Power, C.A., Gordon, S., Martinez-Pomares, L., and Kosco-Vilbois, M.H. (1999). A member of the dendritic cell family that enters B cell follicles

and stimulates primary antibody responses identified by a mannose receptor fusion protein. *J Exp Med* 190, 851-860.

Bimczok, D., Post, A., Tschernig, T., and Rothkotter, H.J. (2006). Phenotype and distribution of dendritic cells in the porcine small intestinal and tracheal mucosa and their spatial relationship to epithelial cells. *Cell and tissue research* 325, 461-468.

Bimczok, D., Sowa, E.N., Faber-Zuschratter, H., Pabst, R., and Rothkotter, H.J. (2005). Site-specific expression of CD11b and SIRPalpha (CD172a) on dendritic cells: implications for their migration patterns in the gut immune system. *European journal of immunology* 35, 1418-1427.

Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S., and Whitlow, M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science (New York, N.Y)* 242, 423-426.

Biswas, S., Reddy, G.S., Srinivasan, V.A., and Rangarajan, P.N. (2001). Preexposure efficacy of a novel combination DNA and inactivated rabies virus vaccine. *Hum Gene Ther* 12, 1917-1922.

Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., Shang, L., Hashimoto, D., Greter, M., Liu, K., Jakubzick, C., Ingersoll, M.A., Leboeuf, M., *et al.* (2009). Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* 31, 513-525.

Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M.C., and Steinman, R.M. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med* 196, 1627-1638.

Bonifaz, L.C., Bonnyay, D.P., Charalambous, A., Darguste, D.I., Fujii, S., Soares, H., Brimnes, M.K., Moltedo, B., Moran, T.M., and Steinman, R.M. (2004). In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med* 199, 815-824.

Booth, J.W., Kim, M.K., Jankowski, A., Schreiber, A.D., and Grinstein, S. (2002). Contrasting requirements for ubiquitylation during Fc receptor-mediated endocytosis and phagocytosis. *EMBO J* 21, 251-258.

Boscardin, S.B., Hafalla, J.C., Masilamani, R.F., Kamphorst, A.O., Zebroski, H.A., Rai, U., Morrot, A., Zavala, F., Steinman, R.M., Nussenzweig, R.S., and Nussenzweig, M.C. (2006). Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. *J Exp Med* 203, 599-606.

Botner, A., Strandbygaard, B., Sorensen, K.J., Have, P., Madsen, K.G., Madsen, E.S., and Alexandersen, S. (1997). Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *Vet Rec* 141, 497-499.

Bover, L.C., Cardo-Vila, M., Kuniyasu, A., Sun, J., Rangel, R., Takeya, M., Aggarwal, B.B., Arap, W., and Pasqualini, R. (2007). A previously unrecognized protein-protein interaction between TWEAK and CD163: potential biological implications. *J Immunol* 178, 8183-8194.

Boyle, J.S., Brady, J.L., and Lew, A.M. (1998). Enhanced responses to a DNA vaccine encoding a fusion antigen that is directed to sites of immune induction. *Nature* 392, 408-411.

Buchner, J., Pastan, I., and Brinkmann, U. (1992). A method for increasing the yield of properly folded recombinant fusion proteins: single-chain immunotoxins from renaturation of bacterial inclusion bodies. *Anal Biochem* 205, 263-270.

- Buechler, C.**, Ritter, M., Orso, E., Langmann, T., Klucken, J., and Schmitz, G. (2000). Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol* 67, 97-103.
- Bullido, R.**, Alonso, F., Gomez del Moral, M., Ezquerro, A., Alvarez, B., Ortuno, and Dominguez, J. (1996). Monoclonal antibody 2F4/11 recognizes the alpha chain of a porcine beta 2 integrin involved in adhesion and complement mediated phagocytosis. *J Immunol Methods* 195, 125-134.
- Bullido, R.**, Domenech, N., Alvarez, B., Alonso, F., Babin, M., Ezquerro, A., Ortuno, E., and Dominguez, J. (1997a). Characterization of five monoclonal antibodies specific for swine class II major histocompatibility antigens and crossreactivity studies with leukocytes of domestic animals. *Dev Comp Immunol* 21, 311-322.
- Bullido, R.**, Gomez del Moral, M., Alonso, F., Ezquerro, A., Zapata, A., Sanchez, C., Ortuno, E., Alvarez, B., and Dominguez, J. (1997b). Monoclonal antibodies specific for porcine monocytes/macrophages: macrophage heterogeneity in the pig evidenced by the expression of surface antigens. *Tissue Antigens* 49, 403-413.
- Bullido, R.**, Gomez del Moral, M., Domenech, N., Alonso, F., Ezquerro, A., and Dominguez, J. (1997c). Monoclonal antibodies to a high molecular weight isoform of porcine CD45: biochemical and tissue distribution analyses. *Vet Immunol Immunopathol* 56, 151-162.
- Burgdorf, S.**, Kautz, A., Bohnert, V., Knolle, P.A., and Kurts, C. (2007). Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science (New York, N.Y)* 316, 612-616.
- Burgdorf, S.**, and Kurts, C. (2008). Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Current opinion in immunology* 20, 89-95.
- Cahalan, M.D.**, Parker, I., Wei, S.H., and Miller, M.J. (2002). Two-photon tissue imaging: seeing the immune system in a fresh light. *Nat Rev Immunol* 2, 872-880.
- Calvert, J.G.**, Slade, D.E., Shields, S.L., Jolie, R., Mannan, R.M., Ankenbauer, R.G., and Welch, S.K. (2007). CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J Virol* 81, 7371-7379.
- Caminschi, I.**, Proietto, A.I., Ahmet, F., Kitsoulis, S., Shin Teh, J., Lo, J.C., Rizzitelli, A., Wu, L., Vremec, D., van Dommelen, S.L., *et al.* (2008). The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood* 112, 3264-3273.
- Cancel-Tirado, S.M.**, Evans, R.B., and Yoon, K.J. (2004). Monoclonal antibody analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 102, 249-262.
- Carlin, A.F.**, Lewis, A.L., Varki, A., and Nizet, V. (2007). Group B streptococcal capsular sialic acids interact with siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes. *J Bacteriol* 189, 1231-1237.
- Carrasco, Y.R.** (2008). B cells as initial sensors of the adaptive immune response. *Inmunología* 27, 95-100.
- Carrasco, Y.R.**, and Batista, F.D. (2007). B cells acquire particulate antigen in a macrophage-rich area at the boundary between the follicle and the subcapsular sinus of the lymph node. *Immunity* 27, 160-171.

- Carter, R.W.**, Thompson, C., Reid, D.M., Wong, S.Y., and Tough, D.F. (2006). Preferential induction of CD4+ T cell responses through in vivo targeting of antigen to dendritic cell-associated C-type lectin-1. *J Immunol* 177, 2276-2284.
- Castro, F.V.**, Tutt, A.L., White, A.L., Teeling, J.L., James, S., French, R.R., and Glennie, M.J. (2008). CD11c provides an effective immunotarget for the generation of both CD4 and CD8 T cell responses. *European journal of immunology* 38, 2263-2273.
- Cedillo-Barron, L.**, Foster-Cuevas, M., Belsham, G.J., Lefevre, F., and Parkhouse, R.M. (2001). Induction of a protective response in swine vaccinated with DNA encoding foot-and-mouth disease virus empty capsid proteins and the 3D RNA polymerase. *The Journal of general virology* 82, 1713-1724.
- Cedillo-Barron, L.**, Foster-Cuevas, M., Cook, A., Gutierrez-Castaneda, B., Kollnberger, S., Lefevre, F., and Parkhouse, R.M. (2003). Immunogenicity of plasmids encoding T and B cell epitopes of foot-and-mouth disease virus (FMDV) in swine. *Vaccine* 21, 4261-4269.
- Cervantes-Barragan, L.**, Zust, R., Weber, F., Spiegel, M., Lang, K.S., Akira, S., Thiel, V., and Ludewig, B. (2007). Control of coronavirus infection through plasmacytoid dendritic-cell-derived type I interferon. *Blood* 109, 1131-1137.
- Condon, C., Watkins, S.C., Celluzzi, C.M., Thompson, K., and Falo, L.D., Jr. (1996). DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nat Med* 2, 1122-1128.
- Corbett, A.J.**, Caminschi, I., McKenzie, B.S., Brady, J.L., Wright, M.D., Mottram, P.L., Hogarth, P.M., Hodder, A.N., Zhan, Y., Tarlinton, D.M., *et al.* (2005). Antigen delivery via two molecules on the CD8- dendritic cell subset induces humoral immunity in the absence of conventional "danger". *European journal of immunology* 35, 2815-2825.
- Cox, R.J.**, Brokstad, K.A., and Ogra, P. (2004). Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scand J Immunol* 59, 1-15.
- Crawley, A.**, Raymond, C., and Wilkie, B.N. (2003). Control of immunoglobulin isotype production by porcine B-cells cultured with cytokines. *Vet Immunol Immunopathol* 97, 141-154.
- Crawley, A.**, and Wilkie, B.N. (2003). Porcine Ig isotypes: function and molecular characteristics. *Vaccine* 21, 2911-2922.
- Crocker, P.R.**, and Gordon, S. (1989). Mouse macrophage hemagglutinin (sheep erythrocyte receptor) with specificity for sialylated glycoconjugates characterized by a monoclonal antibody. *J Exp Med* 169, 1333-1346.
- Crocker, P.R.**, Hill, M., and Gordon, S. (1988). Regulation of a murine macrophage haemagglutinin (sheep erythrocyte receptor) by a species-restricted serum factor. *Immunology* 65, 515-522.
- Crocker, P.R.**, Paulson, J.C., and Varki, A. (2007). Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* 7, 255-266.
- Crocker, P.R.**, Werb, Z., Gordon, S., and Bainton, D.F. (1990). Ultrastructural localization of a macrophage-restricted sialic acid binding hemagglutinin, SER, in macrophage-hematopoietic cell clusters. *Blood* 76, 1131-1138.
- Chamorro, S.**, Revilla, C., Alvarez, B., Alonso, F., Ezquerro, A., and Dominguez, J. (2005). Phenotypic and functional heterogeneity of porcine blood monocytes and its relation with maturation. *Immunology* 114, 63-71.

- Chamorro, S.,** Revilla, C., Alvarez, B., Lopez-Fuertes, L., Ezquerra, A., and Dominguez, J. (2000). Phenotypic characterization of monocyte subpopulations in the pig. *Immunobiology* 202, 82-93.
- Chamorro, S.,** Revilla, C., Gomez, N., Alvarez, B., Alonso, F., Ezquerra, A., and Dominguez, J. (2004). In vitro differentiation of porcine blood CD163- and CD163+ monocytes into functional dendritic cells. *Immunobiology* 209, 57-65.
- Chaplin, P.J.,** De Rose, R., Boyle, J.S., McWaters, P., Kelly, J., Tennent, J.M., Lew, A.M., and Scheerlinck, J.P. (1999). Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect Immun* 67, 6434-6438.
- Charley, B.,** and Lavenant, L. (1990). Characterization of blood mononuclear cells producing IFN alpha following induction by coronavirus-infected cells (porcine transmissible gastroenteritis virus). *Res Immunol* 141, 141-151.
- Chen, D.,** Maa, Y.F., and Haynes, J.R. (2002). Needle-free epidermal powder immunization. *Expert Rev Vaccines* 1, 265-276.
- Chen, L.L.,** Adams, J.C., and Steinman, R.M. (1978). Anatomy of germinal centers in mouse spleen, with special reference to "follicular dendritic cells". *J Cell Biol* 77, 148-164.
- Chen, Y.,** Pikkarainen, T., Elomaa, O., Soininen, R., Kodama, T., Kraal, G., and Tryggvason, K. (2005). Defective microarchitecture of the spleen marginal zone and impaired response to a thymus-independent type 2 antigen in mice lacking scavenger receptors MARCO and SR-A. *J Immunol* 175, 8173-8180.
- Chesney, J.,** Bacher, M., Bender, A., and Bucala, R. (1997). The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6307-6312.
- Damoiseaux, J.G.,** Dopp, E.A., and Dijkstra, C.D. (1991). Cellular binding mechanism on rat macrophages for sialylated glycoconjugates, inhibited by the monoclonal antibody ED3. *J Leukoc Biol* 49, 434-441.
- Danko, I.,** Williams, P., Herweijer, H., Zhang, G., Latendresse, J.S., Bock, I., and Wolff, J.A. (1997). High expression of naked plasmid DNA in muscles of young rodents. *Hum Mol Genet* 6, 1435-1443.
- Davidson, A.H.,** Traub-Dargatz, J.L., Rodeheaver, R.M., Ostlund, E.N., Pedersen, D.D., Moorhead, R.G., Stricklin, J.B., Dewell, R.D., Roach, S.D., Long, R.E., *et al.* (2005). Immunologic responses to West Nile virus in vaccinated and clinically affected horses. *J Am Vet Med Assoc* 226, 240-245.
- Davis, H.L.,** Whalen, R.G., and Demeneix, B.A. (1993). Direct gene transfer into skeletal muscle in vivo: factors affecting efficiency of transfer and stability of expression. *Hum Gene Ther* 4, 151-159.
- Dawson, H.D.,** Beshah, E., Nishi, S., Solano-Aguilar, G., Morimoto, M., Zhao, A., Madden, K.B., Ledbetter, T.K., Dubey, J.P., Shea-Donohue, T., *et al.* (2005). Localized multigene expression patterns support an evolving Th1/Th2-like paradigm in response to infections with *Toxoplasma gondii* and *Ascaris suum*. *Infect Immun* 73, 1116-1128.
- de Baey, A., Mende, I., Riethmueller, G., and Baeuerle, P.A. (2001). Phenotype and function of human dendritic cells derived from M-DC8(+) monocytes. *European journal of immunology* 31, 1646-1655.

- Delamarre, L.**, Pack, M., Chang, H., Mellman, I., and Trombetta, E.S. (2005). Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* (New York, N.Y. 307, 1630-1634.
- Deliyannis, G.**, Boyle, J.S., Brady, J.L., Brown, L.E., and Lew, A.M. (2000). A fusion DNA vaccine that targets antigen-presenting cells increases protection from viral challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6676-6680.
- Delputte, P.L.**, and Nauwynck, H.J. (2004). Porcine arterivirus infection of alveolar macrophages is mediated by sialic acid on the virus. *J Virol* 78, 8094-8101.
- Delputte, P.L.**, Van Breedam, W., Barbe, F., Van Reeth, K., and Nauwynck, H.J. (2007). IFN-alpha treatment enhances porcine Arterivirus infection of monocytes via upregulation of the porcine Arterivirus receptor sialoadhesin. *J Interferon Cytokine Res* 27, 757-766.
- Demangel, C.**, Zhou, J., Choo, A.B., Shoebridge, G., Halliday, G.M., and Britton, W.J. (2005). Single chain antibody fragments for the selective targeting of antigens to dendritic cells. *Mol Immunol* 42, 979-985.
- den Haan, J.M.**, Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2000). CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* 192, 1685-1696.
- Dhama, K.**, Mahendran, M., Gupta, P.K., and Rai, A. (2008). DNA vaccines and their applications in veterinary practice: current perspectives. *Vet Res Commun* 32, 341-356.
- Diamond, G.**, Legarda, D., and Ryan, L.K. (2000). The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunol Rev* 173, 27-38.
- Diaz, I.**, Darwich, L., Pappaterra, G., Pujols, J., and Mateu, E. (2006). Different European-type vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus have different immunological properties and confer different protection to pigs. *Virology* 351, 249-259.
- Diaz, I.**, Pujols, J., Ganges, L., Gimeno, M., Darwich, L., Domingo, M., and Mateu, E. (2009). In silico prediction and ex vivo evaluation of potential T-cell epitopes in glycoproteins 4 and 5 and nucleocapsid protein of genotype-I (European) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* 27, 5603-5611.
- Dijkstra, C.D.**, Dopp, E.A., Joling, P., and Kraal, G. (1985). The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 54, 589-599.
- Domenech, N.**, Rodriguez-Carreno, M.P., Filgueira, P., Alvarez, B., Chamorro, S., and Dominguez, J. (2003). Identification of porcine macrophages with monoclonal antibodies in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Vet Immunol Immunopathol* 94, 77-81.
- Dominguez, J.**, Babin, M., Sanchez, C., and Hedrick, R.P. (1991). Rapid serotyping of infectious pancreatic necrosis virus by one-step enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *Journal of virological methods* 37, 93-103.
- Donnelly, J.J.**, Ulmer, J.B., Shiver, J.W., and Liu, M.A. (1997). DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* 15, 617-648.
- Drake, D.R.**, 3rd, Moser, J.M., Hadley, A., Altman, J.D., Maliszewski, C., Butz, E., and Lukacher, A.E. (2000). Polyomavirus-infected dendritic cells induce antiviral CD8(+) T lymphocytes. *J Virol* 74, 4093-4101.

Droemann, D., Goldmann, T., Branscheid, D., Clark, R., Dalhoff, K., Zabel, P., and Vollmer, E. (2003). Toll-like receptor 2 is expressed by alveolar epithelial cells type II and macrophages in the human lung. *Histochem Cell Biol* 119, 103-108.

Drutman, S.B., and Trombetta, E.S. (2010). Dendritic cells continue to capture and present antigens after maturation in vivo. *J Immunol* 185, 2140-2146.

Dudziak, D., Kamphorst, A.O., Heidkamp, G.F., Buchholz, V.R., Trumpfheller, C., Yamazaki, S., Cheong, C., Liu, K., Lee, H.W., Park, C.G., *et al.* (2007). Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science (New York, N.Y)* 315, 107-111.

Dzionic, A., Sohma, Y., Nagafune, J., Cella, M., Colonna, M., Facchetti, F., Gunther, G., Johnston, I., Lanzavecchia, A., Nagasaka, T., *et al.* (2001). BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med* 194, 1823-1834.

Ezquerro, A., Revilla, C., Alvarez, B., Perez, C., Alonso, F., and Dominguez, J. (2009). Porcine myelomonocytic markers and cell populations. *Dev Comp Immunol* 33, 284-298.

Fabrick, B.O., van Bruggen, R., Deng, D.M., Ligtenberg, A.J., Nazmi, K., Schornagel, K., Vloet, R.P., Dijkstra, C.D., and van den Berg, T.K. (2009). The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood* 113, 887-892.

Faure, F., Dory, D., Le Moigne, V., Gravier, R., and Jestin, A. (2010). Biosafety of DNA vaccines: New generation of DNA vectors and current knowledge on the fate of plasmids after injection. *Vaccine* 28, 3888-3895.

Fazilleau, N., Mark, L., McHeyzer-Williams, L.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2009). Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity* 30, 324-335.

Ferguson, A.R., Youd, M.E., and Corley, R.B. (2004). Marginal zone B cells transport and deposit IgM-containing immune complexes onto follicular dendritic cells. *Int Immunol* 16, 1411-1422.

Finkelman, F.D., Lees, A., Birnbaum, R., Gause, W.C., and Morris, S.C. (1996). Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion. *J Immunol* 157, 1406-1414.

Fitzgerald-Bocarsly, P., and Feng, D. (2007). The role of type I interferon production by dendritic cells in host defense. *Biochimie* 89, 843-855.

Frankenberger, M., Sternsdorf, T., Pechumer, H., Pforte, A., and Ziegler-Heitbrock, H.W. (1996). Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood* 87, 373-377.

Fu, T.M., Ulmer, J.B., Caulfield, M.J., Deck, R.R., Friedman, A., Wang, S., Liu, X., Donnelly, J.J., and Liu, M.A. (1997). Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes. *Mol Med* 3, 362-371.

Ganges, L., Barrera, M., Nunez, J.I., Blanco, I., Frias, M.T., Rodriguez, F., and Sobrino, F. (2005). A DNA vaccine expressing the E2 protein of classical swine fever virus elicits T cell responses that can prime for rapid antibody production and confer total protection upon viral challenge. *Vaccine* 23, 3741-3752.

- Garcia, S.,** DiSanto, J., and Stockinger, B. (1999). Following the development of a CD4 T cell response in vivo: from activation to memory formation. *Immunity* *11*, 163-171.
- Garside, P.,** Ingulli, E., Merica, R.R., Johnson, J.G., Noelle, R.J., and Jenkins, M.K. (1998). Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science* (New York, N.Y. *281*, 96-99.
- Garver, K.A.,** LaPatra, S.E., and Kurath, G. (2005). Efficacy of an infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus DNA vaccine in Chinook *Oncorhynchus tshawytscha* and sockeye *O. nerka* salmon. *Dis Aquat Organ* *64*, 13-22.
- Geissmann, F.,** Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* *19*, 71-82.
- Germain, R.N.,** Miller, M.J., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2006). Dynamic imaging of the immune system: progress, pitfalls and promise. *Nat Rev Immunol* *6*, 497-507.
- Glockshuber, R.,** Malia, M., Pfitzinger, I., and Pluckthun, A. (1990). A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. *Biochemistry* *29*, 1362-1367.
- Goel, A.,** Baranowska-Kortylewicz, J., Hinrichs, S.H., Wisecarver, J., Pavlinkova, G., Augustine, S., Colcher, D., Booth, B.J., and Batra, S.K. (2001). 99mTc-labeled divalent and tetravalent CC49 single-chain Fv's: novel imaging agents for rapid in vivo localization of human colon carcinoma. *J Nucl Med* *42*, 1519-1527.
- Gonin, P.,** Pirzadeh, B., Gagnon, C.A., and Dea, S. (1999). Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein. *J Vet Diagn Invest* *11*, 20-26.
- Gonzalez, S., Mendoza, C.,** Sanchez-Vizcaino, J.M., and Alonso, F. (1990). Inhibitory effect of African swine fever virus on lectin-dependent swine lymphocyte proliferation. *Vet Immunol Immunopathol* *26*, 71-80.
- Gonzalez, S.F.,** Lukacs-Kornek, V., Kuligowski, M.P., Pitcher, L.A., Degn, S.E., Kim, Y.A., Cloninger, M.J., Martinez-Pomares, L., Gordon, S., Turley, S.J., and Carroll, M.C. (2010). Capture of influenza by medullary dendritic cells via SIGN-R1 is essential for humoral immunity in draining lymph nodes. *Nat Immunol* *11*, 427-434.
- Grage-Griebenow, E.,** Flad, H.D., and Ernst, M. (2001a). Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol* *69*, 11-20.
- Grage-Griebenow, E.,** Zawatzky, R., Kahlert, H., Brade, L., Flad, H., and Ernst, M. (2001b). Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes. *European journal of immunology* *31*, 48-56.
- Gronlund, J.,** Vitved, L., Lausen, M., Skjodt, K., and Holmskov, U. (2000). Cloning of a novel scavenger receptor cysteine-rich type I transmembrane molecule (M160) expressed by human macrophages. *J Immunol* *165*, 6406-6415.
- Grouard, G.,** Rissoan, M.C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., and Liu, Y.J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* *185*, 1101-1111.
- Guermonprez, P.,** Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* *20*, 621-667.
- Gunn, M.D. (2003).** Chemokine mediated control of dendritic cell migration and function. *Semin Immunol* *15*, 271-276.

Gurunathan, S., Klinman, D.M., and Seder, R.A. (2000). DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. *Annu Rev Immunol* 18, 927-974.

Guzylack-Piriou, L., Alves, M.P., McCullough, K.C., and Summerfield, A. (2010). Porcine Flt3 ligand and its receptor: generation of dendritic cells and identification of a new marker for porcine dendritic cells. *Dev Comp Immunol* 34, 455-464.

Hammond, S.A., Tsonis, C., Sellins, K., Rushlow, K., Scharton-Kersten, T., Colditz, I., and Glenn, G.M. (2000). Transcutaneous immunization of domestic animals: opportunities and challenges. *Adv Drug Deliv Rev* 43, 45-55.

Hartnell, A., Steel, J., Turley, H., Jones, M., Jackson, D.G., and Crocker, P.R. (2001). Characterization of human sialoadhesin, a sialic acid binding receptor expressed by resident and inflammatory macrophage populations. *Blood* 97, 288-296.

Hauser, A.E., Junt, T., Mempel, T.R., Sneddon, M.W., Kleinstein, S.H., Henrickson, S.E., von Andrian, U.H., Shlomchik, M.J., and Haberman, A.M. (2007). Definition of germinal-center B cell migration in vivo reveals predominant intrazonal circulation patterns. *Immunity* 26, 655-667.

Haverson, K., Bailey, M., Higgins, V.R., Bland, P.W., and Stokes, C.R. (1994). Characterization of monoclonal antibodies specific for monocytes, macrophages and granulocytes from porcine peripheral blood and mucosal tissues. *J Immunol Methods* 170, 233-245.

Haverson, K., Singha, S., Stokes, C.R., and Bailey, M. (2000). Professional and non-professional antigen-presenting cells in the porcine small intestine. *Immunology* 101, 492-500.

Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J.V., Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C. (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 194, 769-779.

He, L.Z., Crocker, A., Lee, J., Mendoza-Ramirez, J., Wang, X.T., Vitale, L.A., O'Neill, T., Petromilli, C., Zhang, H.F., Lopez, J., *et al.* (2007). Antigenic targeting of the human mannose receptor induces tumor immunity. *J Immunol* 178, 6259-6267.

Heijnen, I.A., van Vugt, M.J., Fanger, N.A., Graziano, R.F., de Wit, T.P., Hofhuis, F.M., Guyre, P.M., Capel, P.J., Verbeek, J.S., and van de Winkel, J.G. (1996). Antigen targeting to myeloid-specific human Fc gamma RI/CD64 triggers enhanced antibody responses in transgenic mice. *J Clin Invest* 97, 331-338.

Hein, W.R., and Griebel, P.J. (2003). A road less travelled: large animal models in immunological research. *Nat Rev Immunol* 3, 79-84.

Henri, S., Poulin, L.F., Tamoutounour, S., Ardouin, L., Guillems, M., de Bovis, B., Devilard, E., Viret, C., Azukizawa, H., Kissenpfennig, A., and Malissen, B. (2010). CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J Exp Med* 207, 189-206.

Hertz, C.J., Kiertscher, S.M., Godowski, P.J., Bouis, D.A., Norgard, M.V., Roth, M.D., and Modlin, R.L. (2001). Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 166, 2444-2450.

Hertz, C.J., Wu, Q., Porter, E.M., Zhang, Y.J., Weismuller, K.H., Godowski, P.J., Ganz, T., Randell, S.H., and Modlin, R.L. (2003). Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2. *J Immunol* 171, 6820-6826.

Hirao, L.A., Wu, L., Khan, A.S., Satishchandran, A., Draghia-Akli, R., and Weiner, D.B. (2008). Intradermal/subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pigs and rhesus macaques. *Vaccine* 26, 440-448.

Hochrein, H., Shortman, K., Vremec, D., Scott, B., Hertzog, P., and O'Keeffe, M. (2001). Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. *J Immunol* 166, 5448-5455.

Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., O'Garra, A., and Murphy, K.M. (1993a). Pathogen-induced Th1 phenotype development in CD4+ alpha beta-TCR transgenic T cells is macrophage dependent. *Int Immunol* 5, 371-382.

Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., and Murphy, K.M. (1993b). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science (New York, N.Y)* 260, 547-549.

Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., Novotny, J., Margolies, M.N., Ridge, R.J., Bruccoleri, R.E., Haber, E., Crea, R., and et al. (1988). Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5879-5883.

Huysamen, C., Willment, J.A., Dennehy, K.M., and Brown, G.D. (2008). CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3+ dendritic cells and a subset of monocytes. *The Journal of biological chemistry* 283, 16693-16701.

Iannacone, M., Moseman, E.A., Tonti, E., Bosurgi, L., Junt, T., Henrickson, S.E., Whelan, S.P., Guidotti, L.G., and von Andrian, U.H. (2010). Subcapsular sinus macrophages prevent CNS invasion on peripheral infection with a neurotropic virus. *Nature* 465, 1079-1083.

Ito, T., Inaba, M., Inaba, K., Toki, J., Sogo, S., Iguchi, T., Adachi, Y., Yamaguchi, K., Amakawa, R., Valladeau, J., et al. (1999). A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J Immunol* 163, 1409-1419.

Jackson, D.C., Lau, Y.F., Le, T., Suhrbier, A., Deliyannis, G., Cheers, C., Smith, C., Zeng, W., and Brown, L.E. (2004). A totally synthetic vaccine of generic structure that targets Toll-like receptor 2 on dendritic cells and promotes antibody or cytotoxic T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15440-15445.

Jacob, J., Kassir, R., and Kelsoe, G. (1991a). In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. *J Exp Med* 173, 1165-1175.

Jacob, J., and Kelsoe, G. (1992). In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. II. A common clonal origin for periarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers. *J Exp Med* 176, 679-687.

Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K., and Weiss, U. (1991b). Intracloal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* 354, 389-392.

Jamin, A., Gorin, S., Le Potier, M.F., and Kuntz-Simon, G. (2006). Characterization of conventional and plasmacytoid dendritic cells in swine secondary lymphoid organs and blood. *Vet Immunol Immunopathol* 114, 224-237.

Jenkins, M.K., Khoruts, A., Ingulli, E., Mueller, D.L., McSorley, S.J., Reinhardt, R.L., Itano, A., and Pape, K.A. (2001). In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu Rev Immunol* 19, 23-45.

- Jeong, H.J.**, Song, Y.J., Lee, S.W., Lee, J.B., Park, S.Y., Song, C.S., Ha, G.W., Oh, J.S., Oh, Y.K., and Choi, I.S. (2010). Comparative measurement of cell-mediated immune responses of swine to the M and N proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin Vaccine Immunol* 17, 503-512.
- Jiang, H.R.**, Hwenda, L., Makinen, K., Oetke, C., Crocker, P.R., and Forrester, J.V. (2006a). Sialoadhesin promotes the inflammatory response in experimental autoimmune uveoretinitis. *J Immunol* 177, 2258-2264.
- Jiang, Y.**, Xiao, S., Fang, L., Yu, X., Song, Y., Niu, C., and Chen, H. (2006b). DNA vaccines co-expressing GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) display enhanced immunogenicity. *Vaccine* 24, 2869-2879.
- Johansson, E.**, Domeika, K., Berg, M., Alm, G.V., and Fossum, C. (2003). Characterisation of porcine monocyte-derived dendritic cells according to their cytokine profile. *Vet Immunol Immunopathol* 91, 183-197.
- Jones, C.**, Virji, M., and Crocker, P.R. (2003). Recognition of sialylated meningococcal lipopolysaccharide by siglecs expressed on myeloid cells leads to enhanced bacterial uptake. *Mol Microbiol* 49, 1213-1225.
- Junt, T.**, Moseman, E.A., Iannaccone, M., Massberg, S., Lang, P.A., Boes, M., Fink, K., Henrickson, S.E., Shayakhmetov, D.M., Di Paolo, N.C., *et al.* (2007). Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature* 450, 110-114.
- Junt, T.**, Scandella, E., and Ludewig, B. (2008). Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence. *Nat Rev Immunol* 8, 764-775.
- Kawai, T.**, and Akira, S. (2006). Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* 7, 131-137.
- Keffaber, K.K.** (1989). Reproductive failure of unknown etiology. American Association of Swine Practitioners Newsletter 1, 1-10.
- Kelsoe, G.** (1996). Life and death in germinal centers (redux). *Immunity* 4, 107-111.
- Khan, S.**, Bijker, M.S., Weterings, J.J., Tanke, H.J., Adema, G.J., van Hall, T., Drijfhout, J.W., Melief, C.J., Overkleeft, H.S., van der Marel, G.A., *et al.* (2007). Distinct uptake mechanisms but similar intracellular processing of two different toll-like receptor ligand-peptide conjugates in dendritic cells. *The Journal of biological chemistry* 282, 21145-21159.
- Kim, D.J.**, Chung, J.H., Ryu, Y.S., Rhim, J.H., Kim, C.W., Suh, Y., and Chung, H.K. (2002). Production and characterisation of a recombinant scFv reactive with human gastrointestinal carcinomas. *Br J Cancer* 87, 405-413.
- Kirchberger, S.**, Majdic, O., Steinberger, P., Bluml, S., Pfistershammer, K., Zlabinger, G., Deszcz, L., Kuechler, E., Knapp, W., and Stockl, J. (2005). Human rhinoviruses inhibit the accessory function of dendritic cells by inducing sialoadhesin and B7-H1 expression. *J Immunol* 175, 1145-1152.
- Kissenpfennig, A.**, Henri, S., Dubois, B., Laplace-Builhe, C., Perrin, P., Romani, N., Tripp, C.H., Douillard, P., Leserman, L., Kaiserlian, D., *et al.* (2005). Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 22, 643-654.
- Klechevsky, E.**, Morita, R., Liu, M., Cao, Y., Coquery, S., Thompson-Snipes, L., Briere, F., Chaussabel, D., Zurawski, G., Palucka, A.K., *et al.* (2008). Functional specializations

of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity* 29, 497-510.

Kovacsovics-Bankowski, M., and Rock, K.L. (1994). Presentation of exogenous antigens by macrophages: analysis of major histocompatibility complex class I and II presentation and regulation by cytokines. *European journal of immunology* 24, 2421-2428.

Kozak, M. (1997). Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *EMBO J* 16, 2482-2492.

Kraal, G., and Janse, M. (1986). Marginal metallophilic cells of the mouse spleen identified by a monoclonal antibody. *Immunology* 58, 665-669.

Kristiansen, M., Graversen, J.H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H.J., Law, S.K., and Moestrup, S.K. (2001). Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409, 198-201.

Kunzi, V., Klap, J.M., Seiberling, M.K., Herzog, C., Hartmann, K., Kursteiner, O., Kompier, R., Grimaldi, R., and Goudsmit, J. (2009). Immunogenicity and safety of low dose virosomal adjuvanted influenza vaccine administered intradermally compared to intramuscular full dose administration. *Vaccine* 27, 3561-3567.

Kutzler, M.A., and Weiner, D.B. (2004). Developing DNA vaccines that call to dendritic cells. *J Clin Invest* 114, 1241-1244.

Kutzler, M.A., and Weiner, D.B. (2008). DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev Genet* 9, 776-788.

Kwang, J., Zuckermann, F., Ross, G., Yang, S., Osorio, F., Liu, W., and Low, S. (1999). Antibody and cellular immune responses of swine following immunisation with plasmid DNA encoding the PRRS virus ORF's 4, 5, 6 and 7. *Res Vet Sci* 67, 199-201.

Kwissa, M., von Kampen, K., Zurbriggen, R., Gluck, R., Reimann, J., and Schirmbeck, R. (2000). Efficient vaccination by intradermal or intramuscular inoculation of plasmid DNA expressing hepatitis B surface antigen under desmin promoter/enhancer control. *Vaccine* 18, 2337-2344.

Law, S.K., Micklem, K.J., Shaw, J.M., Zhang, X.P., Dong, Y., Willis, A.C., and Mason, D.Y. (1993). A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily. *European journal of immunology* 23, 2320-2325.

Lechardeur, D., Sohn, K.J., Haardt, M., Joshi, P.B., Monck, M., Graham, R.W., Beatty, B., Squire, J., O'Brodivich, H., and Lukacs, G.L. (1999). Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther* 6, 482-497.

Leon, B., Lopez-Bravo, M., and Ardavin, C. (2007). Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. *Immunity* 26, 519-531.

Li, Y., Luo, L., Thomas, D.Y., and Kang, C.Y. (2000). The HIV-1 Env protein signal sequence retards its cleavage and down-regulates the glycoprotein folding. *Virology* 272, 417-428.

Liu, Y.J. (2005). IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 23, 275-306.

- Liu, Y.J.**, Zhang, J., Lane, P.J., Chan, E.Y., and MacLennan, I.C. (1991). Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *European journal of immunology* 21, 2951-2962.
- Loula, T.** (1991). Mystery pig disease. *Agri Prac* 12, 23-34.
- Lu, S.** (2009). Heterologous prime-boost vaccination. *Current opinion in immunology* 21, 346-351.
- Luo, D.**, Mah, N., Krantz, M., Wilde, K., Wishart, D., Zhang, Y., Jacobs, F., and Martin, L. (1995). VI-linker-Vh orientation-dependent expression of single chain Fv-containing an engineered disulfide-stabilized bond in the framework regions. *J Biochem* 118, 825-831.
- MacLennan, I.**, and Vinuesa, C. (2002). Dendritic cells, BAFF, and APRIL: innate players in adaptive antibody responses. *Immunity* 17, 235-238.
- MacLennan, I.C.** (1994). Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 12, 117-139.
- Mahnke, K.**, Guo, M., Lee, S., Sepulveda, H., Swain, S.L., Nussenzweig, M., and Steinman, R.M. (2000). The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol* 151, 673-684.
- Maldonado-Lopez, R.**, De Smedt, T., Pajak, B., Heirman, C., Thielemans, K., Leo, O., Urbain, J., Maliszewski, C.R., and Moser, M. (1999). Role of CD8alpha+ and CD8alpha-dendritic cells in the induction of primary immune responses in vivo. *J Leukoc Biol* 66, 242-246.
- Malin, A.S.**, Huygen, K., Content, J., Mackett, M., Brandt, L., Andersen, P., Smith, S.M., and Dockrell, H.M. (2000). Vaccinia expression of Mycobacterium tuberculosis-secreted proteins: tissue plasminogen activator signal sequence enhances expression and immunogenicity of M. tuberculosis Ag85. *Microbes Infect* 2, 1677-1685.
- Manickasingham, S.P.**, Edwards, A.D., Schulz, O., and Reis e Sousa, C. (2003). The ability of murine dendritic cell subsets to direct T helper cell differentiation is dependent on microbial signals. *European journal of immunology* 33, 101-107.
- Maniecki, M.B.**, Moller, H.J., Moestrup, S.K., and Moller, B.K. (2006). CD163 positive subsets of blood dendritic cells: the scavenging macrophage receptors CD163 and CD91 are coexpressed on human dendritic cells and monocytes. *Immunobiology* 211, 407-417.
- Manoj, S.**, Griebel, P.J., Babiuk, L.A., and van Drunen Littel-van den Hurk, S. (2003). Targeting with bovine CD154 enhances humoral immune responses induced by a DNA vaccine in sheep. *J Immunol* 170, 989-996.
- Marquet, F.**, Bonneau, M., Pascale, F., Urien, C., Kang, C., Schwartz-Cornil, I., and Bertho, N. (2011). Characterization of dendritic cells subpopulations in skin and afferent lymph in the Swine model. *PLoS One* 6, e16320.
- McKay, P.F.**, Barouch, D.H., Santra, S., Sumida, S.M., Jackson, S.S., Gorgone, D.A., Lifton, M.A., and Letvin, N.L. (2004). Recruitment of different subsets of antigen-presenting cells selectively modulates DNA vaccine-elicited CD4+ and CD8+ T lymphocyte responses. *European journal of immunology* 34, 1011-1020.
- McKenzie, E.J.**, Taylor, P.R., Stillion, R.J., Lucas, A.D., Harris, J., Gordon, S., and Martinez-Pomares, L. (2007). Mannose receptor expression and function define a new population of murine dendritic cells. *J Immunol* 178, 4975-4983.

McKinstry, K.K., Strutt, T.M., and Swain, S.L. (2010). The potential of CD4 T-cell memory. *Immunology* 130, 1-9.

McWilliam, A.S., Tree, P., and Gordon, S. (1992). Interleukin 4 regulates induction of sialoadhesin, the macrophage sialic acid-specific receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10522-10526.

McHeyzer-Williams, L.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2005). Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol* 23, 487-513.

McHeyzer-Williams, L.J., Pelletier, N., Mark, L., Fazilleau, N., and McHeyzer-Williams, M.G. (2009). Follicular helper T cells as cognate regulators of B cell immunity. *Current opinion in immunology* 21, 266-273.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.

Melkebeek, V., Van den Broeck, W., Verdonck, F., Goddeeris, B.M., and Cox, E. (2008). Effect of plasmid DNA encoding the porcine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on antigen-presenting cells in pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 125, 354-360.

Melnick, J., Dul, J.L., and Argon, Y. (1994). Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature* 370, 373-375.

Meng, X.J. (2000). Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet Microbiol* 74, 309-329.

Mengeling, W.L., Lager, K.M., and Vorwald, A.C. (1999). Safety and efficacy of vaccination of pregnant gilts against porcine reproductive and respiratory syndrome. *Am J Vet Res* 60, 796-801.

Meulenberg, J.J., Hulst, M.M., de Meijer, E.J., Moonen, P.L., den Besten, A., de Kluyver, E.P., Wensvoort, G., and Moormann, R.J. (1993). Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology* 192, 62-72.

Meulenberg, J.J., Petersen-den Besten, A., De Kluyver, E.P., Moormann, R.J., Schaaper, W.M., and Wensvoort, G. (1995a). Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology* 206, 155-163.

Meulenberg, J.J., Petersen-den Besten, A., de Kluyver, E.P., Moormann, R.J., Schaaper, W.M., and Wensvoort, G. (1995b). Characterization of structural proteins of Lelystad virus. *Advances in experimental medicine and biology* 380, 271-276.

Meulenberg, J.J., van Nieuwstadt, A.P., van Essen-Zandbergen, A., and Langeveld, J.P. (1997). Posttranslational processing and identification of a neutralization domain of the GP4 protein encoded by ORF4 of Lelystad virus. *J Virol* 71, 6061-6067.

Michelsen, K.S., Aicher, A., Mohaupt, M., Hartung, T., Dimmeler, S., Kirschning, C.J., and Schumann, R.R. (2001). The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCS). Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2. *The Journal of biological chemistry* 276, 25680-25686.

- Millikin, P.D.** (1966). Anatomy of germinal centers in human lymphoid tissue. *Arch Pathol* 82, 499-505.
- Moestrup, S.K.**, and Moller, H.J. (2004). CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. *Ann Med* 36, 347-354.
- Monteiro, V.G.**, Lobato, C.S., Silva, A.R., Medina, D.V., de Oliveira, M.A., Seabra, S.H., de Souza, W., and DaMatta, R.A. (2005). Increased association of *Trypanosoma cruzi* with sialoadhesin positive mice macrophages. *Parasitol Res* 97, 380-385.
- Moreno, J.A.**, Munoz-Garcia, B., Martin-Ventura, J.L., Madrigal-Matute, J., Orbe, J., Paramo, J.A., Ortega, L., Egido, J., and Blanco-Colio, L.M. (2009). The CD163-expressing macrophages recognize and internalize TWEAK: potential consequences in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 207, 103-110.
- Moreno, S.**, Alvarez, B., Poderoso, T., Revilla, C., Ezquerro, A., Alonso, F., and Dominguez, J. (2010). Porcine monocyte subsets differ in the expression of CCR2 and in their responsiveness to CCL2. *Vet Res* 41, 76.
- Morrison, S.L.** (2002). Cloning, expression, and modification of antibody V regions. *Current protocols in immunology* / edited by John E. Coligan ... [et al *Chapter 2*, Unit 2 12.
- Mouries, J.**, Moron, G., Schlecht, G., Escriou, N., Dadaglio, G., and Leclerc, C. (2008). Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation. *Blood* 112, 3713-3722.
- Muerkoster, S.**, Rocha, M., Crocker, P.R., Schirmacher, V., and Umansky, V. (1999). Sialoadhesin-positive host macrophages play an essential role in graft-versus-leukemia reactivity in mice. *Blood* 93, 4375-4386.
- Munday, J.**, Floyd, H., and Crocker, P.R. (1999). Sialic acid binding receptors (siglecs) expressed by macrophages. *J Leukoc Biol* 66, 705-711.
- Munoz, E.**, Vidarte, L., Casado, M.T., Pastor, C., and Vivanco, F. (1998). The C(H)1 domain of IgG is not essential for C3 covalent binding: importance of the other constant domains as targets for C3. *Int Immunol* 10, 97-106.
- Nahrendorf, M.**, Swirski, F.K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J.L., Libby, P., Weissleder, R., and Pittet, M.J. (2007). The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 204, 3037-3047.
- Naik, S.**, Vremec, D., Wu, L., O'Keeffe, M., and Shortman, K. (2003). CD8alpha+ mouse spleen dendritic cells do not originate from the CD8alpha- dendritic cell subset. *Blood* 102, 601-604.
- Naik, S.H.**, Metcalf, D., van Nieuwenhuijze, A., Wicks, I., Wu, L., O'Keeffe, M., and Shortman, K. (2006). Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol* 7, 663-671.
- Nair, S.**, Buiting, A.M., Rouse, R.J., Van Rooijen, N., Huang, L., and Rouse, B.T. (1995). Role of macrophages and dendritic cells in primary cytotoxic T lymphocyte responses. *Int Immunol* 7, 679-688.
- Nchinda, G.**, Kuroiwa, J., Oks, M., Trumpfheller, C., Park, C.G., Huang, Y., Hannaman, D., Schlesinger, S.J., Mizenina, O., Nussenzweig, M.C., *et al.* (2008). The efficacy of DNA vaccination is enhanced in mice by targeting the encoded protein to dendritic cells. *J Clin Invest* 118, 1427-1436.

- Nelson, E.A.**, Christopher-Hennings, J., and Benfield, D.A. (1994). Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *J Vet Diagn Invest* 6, 410-415.
- Neumann, E.J.**, Kliebenstein, J.B., Johnson, C.D., Mabry, J.W., Bush, E.J., Seitzinger, A.H., Green, A.L., and Zimmerman, J.J. (2005). Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 227, 385-392.
- Nielsen, U.B.**, Adams, G.P., Weiner, L.M., and Marks, J.D. (2000). Targeting of bivalent anti-ErbB2 diabody antibody fragments to tumor cells is independent of the intrinsic antibody affinity. *Cancer Res* 60, 6434-6440.
- Nilubol, D.**, Platt, K.B., Halbur, P.G., Torremorell, M., and Harris, D.L. (2004). The effect of a killed porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine treatment on virus shedding in previously PRRSV infected pigs. *Vet Microbiol* 102, 11-18.
- Ochoa, M.T.**, Legaspi, A.J., Hatziris, Z., Godowski, P.J., Modlin, R.L., and Sieling, P.A. (2003). Distribution of Toll-like receptor 1 and Toll-like receptor 2 in human lymphoid tissue. *Immunology* 108, 10-15.
- Ochoa, M.T.**, Loncaric, A., Krutzik, S.R., Becker, T.C., and Modlin, R.L. (2008). "Dermal dendritic cells" comprise two distinct populations: CD1+ dendritic cells and CD209+ macrophages. *J Invest Dermatol* 128, 2225-2231.
- Oetke, C.**, Vinson, M.C., Jones, C., and Crocker, P.R. (2006). Sialoadhesin-deficient mice exhibit subtle changes in B- and T-cell populations and reduced immunoglobulin M levels. *Mol Cell Biol* 26, 1549-1557.
- Ogra, P.L.**, Faden, H.S., Abraham, R., Duffy, L.C., Sun, M., and Minor, P.D. (1991). Effect of prior immunity on the shedding of virulent revertant virus in feces after oral immunization with live attenuated poliovirus vaccines. *J Infect Dis* 164, 191-194.
- Okada, T.**, Miller, M.J., Parker, I., Krummel, M.F., Neighbors, M., Hartley, S.B., O'Garra, A., Cahalan, M.D., and Cyster, J.G. (2005). Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. *PLoS Biol* 3, e150.
- Openshaw, P.**, Murphy, E.E., Hosken, N.A., Maino, V., Davis, K., Murphy, K., and O'Garra, A. (1995). Heterogeneity of intracellular cytokine synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations. *J Exp Med* 182, 1357-1367.
- Owen, M.**, Gandeche, A., Cockburn, B., and Whitelam, G. (1992). Synthesis of a functional anti-phytochrome single-chain Fv protein in transgenic tobacco. *Biotechnology (N Y)* 10, 790-794.
- Pack, M.**, Trumpfheller, C., Thomas, D., Park, C.G., Granelli-Piperno, A., Munz, C., and Steinman, R.M. (2008). DEC-205/CD205+ dendritic cells are abundant in the white pulp of the human spleen, including the border region between the red and white pulp. *Immunology* 123, 438-446.
- Paillet, R.**, Laval, F., Audonnet, J.C., Andreoni, C., and Juillard, V. (2001). Functional and phenotypic characterization of distinct porcine dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Immunology* 102, 396-404.
- Paquette, R.L.**, Hsu, N.C., Kiertscher, S.M., Park, A.N., Tran, L., Roth, M.D., and Glaspy, J.A. (1998). Interferon-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating

factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol* 64, 358-367.

Passlick, B., Flieger, D., and Ziegler-Heitbrock, H.W. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74, 2527-2534.

Paul, W.E., and Seder, R.A. (1994). Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76, 241-251.

Pavlinkova, G., Beresford, G., Booth, B.J., Batra, S.K., and Colcher, D. (1999). Charge-modified single chain antibody constructs of monoclonal antibody CC49: generation, characterization, pharmacokinetics, and biodistribution analysis. *Nucl Med Biol* 26, 27-34.

Peipp, M., Saul, D., Barbin, K., Bruenke, J., Zunino, S.J., Niederweis, M., and Fey, G.H. (2004). Efficient eukaryotic expression of fluorescent scFv fusion proteins directed against CD antigens for FACS applications. *J Immunol Methods* 285, 265-280.

Peng, Y., Latchman, Y., and Elkon, K.B. (2009). Ly6C(low) monocytes differentiate into dendritic cells and cross-tolerize T cells through PDL-1. *J Immunol* 182, 2777-2785.

Pérez, C., Ortuño, E., Gómez, N., García-Briones, M., Álvarez, B., Martínez de la Riva, P., Alonso, F., Revilla, C., Domínguez, J., and Ezquerra, A. (2008). Cloning and expresión of porcine CD163: its use for characterization of monoclonal antibodies to porcine CD163 and development of an ELISA to measure soluble CD163 in biological fluids. *Spanish J of Agr Res* 6, 1-14.

Perez, C., Revilla, C., Alvarez, B., Chamorro, S., Correa, C., Domenech, N., Alonso, F., Ezquerra, A., and Dominguez, J. (2007). Phenotypic and functional characterization of porcine granulocyte developmental stages using two new markers. *Dev Comp Immunol* 31, 296-306.

Pescovitz, M.D., Book, B.K., Aasted, B., Dominguez, J., Ezquerra, A., Trebichavsky, I., Novikov, B., Valpotic, I., Nielsen, J., Arn, S., *et al.* (1998). Analyses of monoclonal antibodies reacting with porcine CD3: results from the Second International Swine CD Workshop. *Vet Immunol Immunopathol* 60, 261-268.

Pescovitz, M.D., Lunney, J.K., and Sachs, D.H. (1984). Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL. *J Immunol* 133, 368-375.

Phan, T.G., and Chtanova, T. (2010). Border patrol: SCS macrophages activate iNKT cells too. *Immunology and cell biology* 88, 619-621.

Phan, T.G., Green, J.A., Gray, E.E., Xu, Y., and Cyster, J.G. (2009). Immune complex relay by subcapsular sinus macrophages and noncognate B cells drives antibody affinity maturation. *Nat Immunol* 10, 786-793.

Phan, T.G., Grigorova, I., Okada, T., and Cyster, J.G. (2007). Subcapsular encounter and complement-dependent transport of immune complexes by lymph node B cells. *Nat Immunol* 8, 992-1000.

Pirzadeh, B., and Dea, S. (1997). Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. *The Journal of general virology* 78 (Pt 8), 1867-1873.

- Pirzadeh, B.**, and Dea, S. (1998). Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *The Journal of general virology* 79 (Pt 5), 989-999.
- Pooley, J.L.**, Heath, W.R., and Shortman, K. (2001). Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J Immunol* 166, 5327-5330.
- Porgador, A.**, Irvine, K.R., Iwasaki, A., Barber, B.H., Restifo, N.P., and Germain, R.N. (1998). Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. *J Exp Med* 188, 1075-1082.
- Pozzi, L.A.**, Maciaszek, J.W., and Rock, K.L. (2005). Both dendritic cells and macrophages can stimulate naive CD8 T cells in vivo to proliferate, develop effector function, and differentiate into memory cells. *J Immunol* 175, 2071-2081.
- Prajeeth, C.K.**, Jirmo, A.C., Krishnaswamy, J.K., Ebensen, T., Guzman, C.A., Weiss, S., Constabel, H., Schmidt, R.E., and Behrens, G.M. (2010). The synthetic TLR2 agonist BPPcysMPEG leads to efficient cross-priming against co-administered and linked antigens. *European journal of immunology* 40, 1272-1283.
- Prieto, C.**, Suarez, P., Simarro, I., Garcia, C., Fernandez, A., and Castro, J.M. (1997). Transplacental infection following exposure of gilts to porcine reproductive and respiratory syndrome virus at the onset of gestation. *Vet Microbiol* 57, 301-311.
- Pulendran, B.**, Lingappa, J., Kennedy, M.K., Smith, J., Teepe, M., Rudensky, A., Maliszewski, C.R., and Maraskovsky, E. (1997). Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *J Immunol* 159, 2222-2231.
- Pulendran, B.**, Smith, J.L., Caspary, G., Brasel, K., Pettit, D., Maraskovsky, E., and Maliszewski, C.R. (1999). Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1036-1041.
- Pulendran, B.**, Smith, J.L., Jenkins, M., Schoenborn, M., Maraskovsky, E., and Maliszewski, C.R. (1998). Prevention of peripheral tolerance by a dendritic cell growth factor: flt3 ligand as an adjuvant. *J Exp Med* 188, 2075-2082.
- Pulliam, L.**, Sun, B., and Rempel, H. (2004). Invasive chronic inflammatory monocyte phenotype in subjects with high HIV-1 viral load. *J Neuroimmunol* 157, 93-98.
- Reed, L.J.**, and Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg* 27, 493-497.
- Reimann, K.A.**, Waite, B.C., Lee-Parritz, D.E., Lin, W., Uchanska-Ziegler, B., O'Connell, M.J., and Letvin, N.L. (1994). Use of human leukocyte-specific monoclonal antibodies for clinically immunophenotyping lymphocytes of rhesus monkeys. *Cytometry* 17, 102-108.
- Reis e Sousa, C.** (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 6, 476-483.
- Reis e Sousa, C.**, Hieny, S., Scharton-Kersten, T., Jankovic, D., Charest, H., Germain, R.N., and Sher, A. (1997). In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* 186, 1819-1829.
- Revilla, C.**, Poderoso, T., Martinez, P., Alvarez, B., Lopez-Fuertes, L., Alonso, F., Ezquerro, A., and Dominguez, J. (2009). Targeting to porcine sialoadhesin receptor improves antigen presentation to T cells. *Vet Res* 40, 14.

- Richmond, J.F.**, Lu, S., Santoro, J.C., Weng, J., Hu, S.L., Montefiori, D.C., and Robinson, H.L. (1998). Studies of the neutralizing activity and avidity of anti-human immunodeficiency virus type 1 Env antibody elicited by DNA priming and protein boosting. *J Virol* 72, 9092-9100.
- Rock, F.L.**, Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R.A., and Bazan, J.F. (1998). A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 588-593.
- Rock, K.L.**, Rothstein, L., Gamble, S., and Fleischacker, C. (1993). Characterization of antigen-presenting cells that present exogenous antigens in association with class I MHC molecules. *J Immunol* 150, 438-446.
- Romani, N.**, Thurnher, M., Idoyaga, J., Steinman, R.M., and Flacher, V. (2010). Targeting of antigens to skin dendritic cells: possibilities to enhance vaccine efficacy. *Immunology and cell biology* 88, 424-430.
- Rompato, G.**, Ling, E., Chen, Z., Van Kruiningen, H., and Garmendia, A.E. (2006). Positive inductive effect of IL-2 on virus-specific cellular responses elicited by a PRRSV-ORF7 DNA vaccine in swine. *Vet Immunol Immunopathol* 109, 151-160.
- Rossow, K.D.**, Collins, J.E., Goyal, S.M., Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., and Benfield, D.A. (1995). Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Vet Pathol* 32, 361-373.
- Rossow, K.D.**, Laube, K.L., Goyal, S.M., and Collins, J.E. (1996). Fetal microscopic lesions in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced abortion. *Vet Pathol* 33, 95-99.
- Royaee, A.R.**, Husmann, R.J., Dawson, H.D., Calzada-Nova, G., Schnitzlein, W.M., Zuckermann, F.A., and Lunney, J.K. (2004). Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* 102, 199-216.
- Sailaja, G.**, Husain, S., Nayak, B.P., and Jabbar, A.M. (2003). Long-term maintenance of gp120-specific immune responses by genetic vaccination with the HIV-1 envelope genes linked to the gene encoding Flt-3 ligand. *J Immunol* 170, 2496-2507.
- Sallusto, F.**, Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182, 389-400.
- Sallusto, F.**, and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179, 1109-1118.
- Sanchez-Torres, C.**, Gomez-Puertas, P., Gomez-del-Moral, M., Alonso, F., Escribano, J.M., Ezquerro, A., and Dominguez, J. (2003). Expression of porcine CD163 on monocytes/macrophages correlates with permissiveness to African swine fever infection. *Archives of virology* 148, 2307-2323.
- Sanchez, C.**, Domenech, N., Vazquez, J., Alonso, F., Ezquerro, A., and Dominguez, J. (1999). The porcine 2A10 antigen is homologous to human CD163 and related to macrophage differentiation. *J Immunol* 162, 5230-5237.

- Sancho, D.**, Mourao-Sa, D., Joffre, O.P., Schulz, O., Rogers, N.C., Pennington, D.J., Carlyle, J.R., and Reis e Sousa, C. (2008). Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J Clin Invest* 118, 2098-2110.
- Sanders, S.K.**, Crean, S.M., Boxer, P.A., Kellner, D., LaRosa, G.J., and Hunt, S.W., 3rd (2000). Functional differences between monocyte chemotactic protein-1 receptor A and monocyte chemotactic protein-1 receptor B expressed in a Jurkat T cell. *J Immunol* 165, 4877-4883.
- Scortti, M.**, Prieto, C., Martinez-Lobo, F.J., Simarro, I., and Castro, J.M. (2006). Effects of two commercial European modified-live vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in pregnant gilts. *Vet J* 172, 506-514.
- Schirrmann, T.**, Al-Halabi, L., Dubel, S., and Hust, M. (2008). Production systems for recombinant antibodies. *Front Biosci* 13, 4576-4594.
- Schjetne, K.W.**, Thompson, K.M., Nilsen, N., Flo, T.H., Fleckenstein, B., Iversen, J.G., Espevik, T., and Bogen, B. (2003). Cutting edge: link between innate and adaptive immunity: Toll-like receptor 2 internalizes antigen for presentation to CD4+ T cells and could be an efficient vaccine target. *J Immunol* 171, 32-36.
- Schnorrer, P.**, Behrens, G.M., Wilson, N.S., Pooley, J.L., Smith, C.M., El-Sukkari, D., Davey, G., Kupresanin, F., Li, M., Maraskovsky, E., *et al.* (2006). The dominant role of CD8+ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10729-10734.
- Schwickert, T.A.**, Lindquist, R.L., Shakhar, G., Livshits, G., Skokos, D., Kosco-Vilbois, M.H., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2007). In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure. *Nature* 446, 83-87.
- Serbina, N.V.**, Jia, T., Hohl, T.M., and Pamer, E.G. (2008). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 26, 421-452.
- Sharma, A.K.**, and Khuller, G.K. (2001). DNA vaccines: future strategies and relevance to intracellular pathogens. *Immunology and cell biology* 79, 537-546.
- Shevach, E.M. (2006). From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 25, 195-201.
- Shkreta, L.**, Talbot, B.G., and Lacasse, P. (2003). Optimization of DNA vaccination immune responses in dairy cows: effect of injection site and the targeting efficacy of antigen-bCTLA-4 complex. *Vaccine* 21, 2372-2382.
- Shortman, K.**, and Liu, Y.J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2, 151-161.
- Shurin, M.R.**, Pandharipande, P.P., Zorina, T.D., Haluszczak, C., Subbotin, V.M., Hunter, O., Brumfield, A., Storkus, W.J., Maraskovsky, E., and Lotze, M.T. (1997). FLT3 ligand induces the generation of functionally active dendritic cells in mice. *Cell Immunol* 179, 174-184.
- Sin, J.**, Kim, J.J., Pachuk, C., Satishchandran, C., and Weiner, D.B. (2000). DNA vaccines encoding interleukin-8 and RANTES enhance antigen-specific Th1-type CD4(+) T-cell-mediated protective immunity against herpes simplex virus type 2 in vivo. *J Virol* 74, 11173-11180.
- Sinkora, J.**, Rehakova, Z., Samankova, L., Haverson, K., Butler, J.E., Zwart, R., and Boersma, W. (2001). Characterization of monoclonal antibodies recognizing immunoglobulin kappa and lambda chains in pigs by flow cytometry. *Vet Immunol Immunopathol* 80, 79-91.

- Skerra, A.**, and Pluckthun, A. (1988). Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science (New York, N.Y)* *240*, 1038-1041.
- Soares, H.**, Waechter, H., Glaichenhaus, N., Mougneau, E., Yagita, H., Mizenina, O., Dudziak, D., Nussenzweig, M.C., and Steinman, R.M. (2007). A subset of dendritic cells induces CD4⁺ T cells to produce IFN-gamma by an IL-12-independent but CD70-dependent mechanism in vivo. *J Exp Med* *204*, 1095-1106.
- Somasundaram, C.**, Takamatsu, H., Andreoni, C., Audonnet, J.C., Fischer, L., Lefevre, F., and Charley, B. (1999). Enhanced protective response and immuno-adjuvant effects of porcine GM-CSF on DNA vaccination of pigs against Aujeszky's disease virus. *Vet Immunol Immunopathol* *70*, 277-287.
- Steiniger, B.**, Barth, P., Herbst, B., Hartnell, A., and Crocker, P.R. (1997). The species-specific structure of microanatomical compartments in the human spleen: strongly sialoadhesin-positive macrophages occur in the perfollicular zone, but not in the marginal zone. *Immunology* *92*, 307-316.
- Steinman, R.M.** (2003). Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS* *111*, 675-697.
- Steinman, R.M.**, and Idoyaga, J. (2010). Features of the dendritic cell lineage. *Immunol Rev* *234*, 5-17.
- Stockinger, B.**, and Veldhoen, M. (2007). Differentiation and function of Th17 T cells. *Current opinion in immunology* *19*, 281-286.
- Storgaard, T.**, Oleksiewicz, M., and Botner, A. (1999). Examination of the selective pressures on a live PRRS vaccine virus. *Archives of virology* *144*, 2389-2401.
- Sugimura, T.**, Ito, Y., Tananari, Y., Ozaki, Y., Maeno, Y., Yamaoka, T., and Kudo, Y. (2008). Improved antibody responses in infants less than 1 year old using intradermal influenza vaccination. *Vaccine* *26*, 2700-2705.
- Sulahian, T.H.**, Hogger, P., Wahner, A.E., Wardwell, K., Goulding, N.J., Sorg, C., Droste, A., Stehling, M., Wallace, P.K., Morganelli, P.M., and Guyre, P.M. (2000). Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. *Cytokine* *12*, 1312-1321.
- Summerfield, A.**, Guzylack-Piriou, L., Schaub, A., Carrasco, C.P., Tache, V., Charley, B., and McCullough, K.C. (2003). Porcine peripheral blood dendritic cells and natural interferon-producing cells. *Immunology* *110*, 440-449.
- Sunderkotter, C.**, Nikolic, T., Dillon, M.J., Van Rooijen, N., Stehling, M., Drevets, D.A., and Leenen, P.J. (2004). Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* *172*, 4410-4417.
- Suradhat, S.**, and Thanawongnuwech, R. (2003). Upregulation of interleukin-10 gene expression in the leukocytes of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *The Journal of general virology* *84*, 2755-2760.
- Suzuki, H.**, Katayama, N., Ikuta, Y., Mukai, K., Fujieda, A., Mitani, H., Araki, H., Miyashita, H., Hoshino, N., Nishikawa, H., *et al.* (2004). Activities of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on monocytes. *Am J Hematol* *75*, 179-189.
- Tacke, F.**, and Randolph, G.J. (2006). Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* *211*, 609-618.

- Tacken, P.J.**, de Vries, I.J., Gijzen, K., Joosten, B., Wu, D., Rother, R.P., Faas, S.J., Punt, C.J., Torensma, R., Adema, G.J., and Figdor, C.G. (2005). Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody. *Blood* 106, 1278-1285.
- Tacken, P.J.**, de Vries, I.J., Torensma, R., and Figdor, C.G. (2007). Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nat Rev Immunol* 7, 790-802.
- Tachedjian, M.**, Boyle, J.S., Lew, A.M., Horvatic, B., Scheerlinck, J.P., Tennent, J.M., and Andrew, M.E. (2003). Gene gun immunization in a preclinical model is enhanced by B7 targeting. *Vaccine* 21, 2900-2905.
- Tagliani, E.**, Guernonprez, P., Sepulveda, J., Lopez-Bravo, M., Ardavin, C., Amigorena, S., Benvenuti, F., and Burrone, O.R. (2008). Selection of an antibody library identifies a pathway to induce immunity by targeting CD36 on steady-state CD8 alpha+ dendritic cells. *J Immunol* 180, 3201-3209.
- Tang, D.C.**, DeVit, M., and Johnston, S.A. (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356, 152-154.
- Taylor, P.R.**, Zamze, S., Stillion, R.J., Wong, S.Y., Gordon, S., and Martinez-Pomares, L. (2004). Development of a specific system for targeting protein to metallophilic macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1963-1968.
- Todorovska, A.**, Roovers, R.C., Dolezal, O., Kortt, A.A., Hoogenboom, H.R., and Hudson, P.J. (2001). Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *J Immunol Methods* 248, 47-66.
- Tohno, M.**, Shimosato, T., Kitazawa, H., Katoh, S., Iliev, I.D., Kimura, T., Kawai, Y., Watanabe, K., Aso, H., Yamaguchi, T., and Saito, T. (2005). Toll-like receptor 2 is expressed on the intestinal M cells in swine. *Biochemical and biophysical research communications* 330, 547-554.
- Tunheim, G.**, Schjetne, K.W., Fredriksen, A.B., Sandlie, I., and Bogen, B. (2005). Human CD14 is an efficient target for recombinant immunoglobulin vaccine constructs that deliver T cell epitopes. *J Leukoc Biol* 77, 303-310.
- Tunheim, G.**, Thompson, K.M., Fredriksen, A.B., Espevik, T., Schjetne, K.W., and Bogen, B. (2007). Human receptors of innate immunity (CD14, TLR2) are promising targets for novel recombinant immunoglobulin-based vaccine candidates. *Vaccine* 25, 4723-4734.
- Ulmer, J.B.**, Deck, R.R., Dewitt, C.M., Donnhly, J.I., and Liu, M.A. (1996). Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: antigen presentation by non-muscle cells. *Immunology* 89, 59-67.
- Ulmer, J.B.**, Donnelly, J.J., Parker, S.E., Rhodes, G.H., Felgner, P.L., Dwarki, V.J., Gromkowski, S.H., Deck, R.R., DeWitt, C.M., Friedman, A., and et al. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science (New York, N.Y)* 259, 1745-1749.
- Umansky, V.**, Beckhove, P., Rocha, M., Kruger, A., Crocker, P.R., and Schirmmacher, V. (1996). A role for sialoadhesin-positive tissue macrophages in host resistance to lymphoma metastasis in vivo. *Immunology* 87, 303-309.
- Van Breedam, W.**, Van Gorp, H., Zhang, J.Q., Crocker, P.R., Delputte, P.L., and Nauwynck, H.J. (2010). The M/GP(5) glycoprotein complex of porcine reproductive and

respiratory syndrome virus binds the sialoadhesin receptor in a sialic acid-dependent manner. *PLoS Pathog* 6, e1000730.

van den Berg, T.K., van Die, I., de Lavalette, C.R., Dopp, E.A., Smit, L.D., van der Meide, P.H., Tilders, F.J., Crocker, P.R., and Dijkstra, C.D. (1996). Regulation of sialoadhesin expression on rat macrophages. Induction by glucocorticoids and enhancement by IFN-beta, IFN-gamma, IL-4, and lipopolysaccharide. *J Immunol* 157, 3130-3138.

Van den Heuvel, M.M., Tensen, C.P., van As, J.H., Van den Berg, T.K., Fluitsma, D.M., Dijkstra, C.D., Dopp, E.A., Droste, A., Van Gaalen, F.A., Sorg, C., *et al.* (1999). Regulation of CD 163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation. *J Leukoc Biol* 66, 858-866.

van Drunen Littel-van den Hurk, S., Babiuk, S.L., and Babiuk, L.A. (2004). Strategies for improved formulation and delivery of DNA vaccines to veterinary target species. *Immunol Rev* 199, 113-125.

Van Gorp, H., Delputte, P.L., and Nauwynck, H.J. (2010). Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy. *Mol Immunol* 47, 1650-1660.

Van Gorp, H., Van Breedam, W., Delputte, P.L., and Nauwynck, H.J. (2008). Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *The Journal of general virology* 89, 2943-2953.

van Rooij, E.M., Haagmans, B.L., de Visser, Y.E., de Bruin, M.G., Boersma, W., and Bianchi, A.T. (1998). Effect of vaccination route and composition of DNA vaccine on the induction of protective immunity against pseudorabies infection in pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 66, 113-126.

Vanderheijden, N., Delputte, P.L., Favoreel, H.W., Vandekerckhove, J., Van Damme, J., van Woensel, P.A., and Nauwynck, H.J. (2003). Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *J Virol* 77, 8207-8215.

Vardaxis, N.J., Brans, T.A., Boon, M.E., Kreis, R.W., and Marres, L.M. (1997). Confocal laser scanning microscopy of porcine skin: implications for human wound healing studies. *J Anat* 190 (Pt 4), 601-611.

Varol, C., Vallon-Eberhard, A., Elinav, E., Aychek, T., Shapira, Y., Luche, H., Fehling, H.J., Hardt, W.D., Shakhar, G., and Jung, S. (2009). Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity* 31, 502-512.

Volkman, A., and Gowans, J.L. (1965). The Origin of Macrophages from Bone Marrow in the Rat. *Br J Exp Pathol* 46, 62-70.

Wang, S., Arthos, J., Lawrence, J.M., Van Ryk, D., Mboudjeka, I., Shen, S., Chou, T.H., Montefiori, D.C., and Lu, S. (2005). Enhanced immunogenicity of gp120 protein when combined with recombinant DNA priming to generate antibodies that neutralize the JR-FL primary isolate of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 79, 7933-7937.

Wang, S., Parker, C., Taaffe, J., Solorzano, A., Garcia-Sastre, A., and Lu, S. (2008). Heterologous HA DNA vaccine prime-inactivated influenza vaccine boost is more effective than using DNA or inactivated vaccine alone in eliciting antibody responses against H1 or H3 serotype influenza viruses. *Vaccine* 26, 3626-3633.

Wang, W.W., Das, D., and Suresh, M.R. (2009). A versatile bifunctional dendritic cell targeting vaccine vector. *Mol Pharm* 6, 158-172.

- Watts, C.**, West, M.A., and Zaru, R. (2010). TLR signalling regulated antigen presentation in dendritic cells. *Current opinion in immunology* 22, 124-130.
- Weeks-Levy, C.**, Tatem, J.M., DiMichele, S.J., Waterfield, W., Georgiu, A.F., and Mento, S.J. (1991). Identification and characterization of a new base substitution in the vaccine strain of Sabin 3 poliovirus. *Virology* 185, 934-937.
- Wei, H.**, Wang, S., Zhang, D., Hou, S., Qian, W., Li, B., Guo, H., Kou, G., He, J., Wang, H., and Guo, Y. (2009). Targeted delivery of tumor antigens to activated dendritic cells via CD11c molecules induces potent antitumor immunity in mice. *Clin Cancer Res* 15, 4612-4621.
- Weiland, E.**, Wieczorek-Krohmer, M., Kohl, D., Conzelmann, K.K., and Weiland, F. (1999). Monoclonal antibodies to the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to the GP4. *Vet Microbiol* 66, 171-186.
- Wienhold, D.**, Armengol, E., Marquardt, A., Marquardt, C., Voigt, H., Buttner, M., Saalmuller, A., and Pfaff, E. (2005). Immunomodulatory effect of plasmids co-expressing cytokines in classical swine fever virus subunit gp55/E2-DNA vaccination. *Vet Res* 36, 571-587.
- Wolff, J.A.**, Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., and Felgner, P.L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science (New York, N.Y)* 247, 1465-1468.
- Wolfs, T.G.**, Buurman, W.A., van Schadewijk, A., de Vries, B., Daemen, M.A., Hiemstra, P.S., and van 't Veer, C. (2002). In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol* 168, 1286-1293.
- Worn, A.**, and Pluckthun, A. (2001). Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J Mol Biol* 305, 989-1010.
- Wu, C.**, Rauch, U., Korpos, E., Song, J., Loser, K., Crocker, P.R., and Sorokin, L.M. (2009). Sialoadhesin-positive macrophages bind regulatory T cells, negatively controlling their expansion and autoimmune disease progression. *J Immunol* 182, 6508-6516.
- Wykes, M.**, Pombo, A., Jenkins, C., and MacPherson, G.G. (1998). Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *J Immunol* 161, 1313-1319.
- Xue, Q.**, Zhao, Y.G., Zhou, Y.J., Qiu, H.J., Wang, Y.F., Wu, D.L., Tian, Z.J., and Tong, G.Z. (2004). Immune responses of swine following DNA immunization with plasmids encoding porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORFs 5 and 7, and porcine IL-2 and IFNgamma. *Vet Immunol Immunopathol* 102, 291-298.
- Yang, L.**, Frey, M.L., Yoon, K.J., Zimmerman, J.J., and Platt, K.B. (2000). Categorization of North American porcine reproductive and respiratory syndrome viruses: epitopic profiles of the N, M, GP5 and GP3 proteins and susceptibility to neutralization. *Archives of virology* 145, 1599-1619.
- Yazaki, P.J.**, Wu, A.M., Tsai, S.W., Williams, L.E., Ikler, D.N., Wong, J.Y., Shively, J.E., and Raubitschek, A.A. (2001). Tumor targeting of radiometal labeled anti-CEA recombinant T84.66 diabody and t84.66 minibody: comparison to radioiodinated fragments. *Bioconjug Chem* 12, 220-228.

Yokota, T., Milenic, D.E., Whitlow, M., and Schlom, J. (1992). Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res* 52, 3402-3408.

Young, N.M., MacKenzie, C.R., Narang, S.A., Oomen, R.P., and Baenziger, J.E. (1995). Thermal stabilization of a single-chain Fv antibody fragment by introduction of a disulphide bond. *FEBS Lett* 377, 135-139.

Zhang, J., Raper, A., Sugita, N., Hingorani, R., Salio, M., Palmowski, M.J., Cerundolo, V., and Crocker, P.R. (2006). Characterization of Siglec-H as a novel endocytic receptor expressed on murine plasmacytoid dendritic cell precursors. *Blood* 107, 3600-3608.

Zhou, L., Chong, M.M., and Littman, D.R. (2009). Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* 30, 646-655.

Zhu, X., Ramos, T.V., Gras-Masse, H., Kaplan, B.E., and BenMohamed, L. (2004). Lipopeptide epitopes extended by an Nepsilon-palmitoyl-lysine moiety increase uptake and maturation of dendritic cells through a Toll-like receptor-2 pathway and trigger a Th1-dependent protective immunity. *European journal of immunology* 34, 3102-3114.

Ziegler-Heitbrock, H.W. (1996). Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+ CD16+ subpopulation. *Immunol Today* 17, 424-428.

Ziegler-Heitbrock, H.W., Fingerle, G., Strobel, M., Schraut, W., Stelter, F., Schutt, C., Passlick, B., and Pforte, A. (1993). The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *European journal of immunology* 23, 2053-2058.

Zimmerman, J.J., Benfield, D.A., Murtaugh, P., Osorio, F., Stevenson, G.W., and Torremorell, M. (2006). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Diseases of Swine 9th ed: *Straw BA, Zimmerman JJ, D'Allaire, Taylor DJ. Iowa*, p387-416.

Zou, G.M., and Tam, Y.K. (2002). Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances. *Eur Cytokine Netw* 13, 186-199.

Zuckermann, F.A., Garcia, E.A., Luque, I.D., Christopher-Hennings, J., Doster, A., Brito, M., and Osorio, F. (2007). Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge. *Vet Microbiol* 123, 69-85.

Durante la realización de esta tesis doctoral se publicaron los siguientes artículos:

- Revilla, C., Poderoso, T., Martinez, P., Alvarez, B., Lopez-Fuertes, L., Alonso, F., Ezquerra, A., and Dominguez, J. (2009). Targeting to porcine sialoadhesin receptor improves antigen presentation to T cells. *Vet Res* 40, 14.
- Moreno, S., Alvarez, B., Poderoso, T., Revilla, C., Ezquerra, A., Alonso, F., and Dominguez, J. (2010). Porcine monocyte subsets differ in the expression of CCR2 and in their responsiveness to CCL2. *Vet Res* 41, 76.
- Poderoso, T., Martinez, P., Alvarez, B., Handler, A., Moreno, S., Alonso, F., Ezquerra, A., Dominguez, J., and Revilla, C. (2011). Delivery of antigen to sialoadhesin or CD163 improves the specific immune response in pigs. *Vaccine* 29, 4813-4820.